THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE DE SCIENCES

Présentée par Maria Beatriz CRESTA à l'Université de Paris VII pour obtenir le titre de:

Docteur de l'Université de Paris (mention: sciences-naturelles)

Sujet de la thèse: Etude et localisation de l'activité nucléoside triphosphate phosphohydrolase (NTPase) associée au virus de la variole du lapin et mise en évidence de l'adsorption d'enzymes d'origine cellulaire sur une particule virale.

Soutenue le 7 Décembre 1973 devant la commission d'examen:

MM.	F. CHAPEVILLE	Président
	F. GROS	Examinateurs
	J. P. AUBERT	
	R. VILAGINES	Membre invité

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE DE SCIENCES

Présentée par Maria Beatriz CRESTA à l'Université de Paris VII pour obtenir le titre de:

Docteur de l'Université de Paris (mention: sciences-naturelles)

Sujet de la thèse: Etude et localisation de l'activité nucléoside triphosphate phosphohydrolase (NTPase) associée au virus de la variole du lapin et mise en évidence de l'adsorption d'enzymes d'origine cellulaire sur une particule virale.

Soutenue le 7 Décembre 1973 devant la commission d'examen:

MM.	F. CHAPEVILLE)	Président
	F. GROS)	Examinateurs
	J. P. AUBERT)	
	R. VILAGINES)	Membre invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je présente mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur F. CHAPEVILLE pour avoir bien voulu présider ce jury.

J'adresse mes remerciements très respectueux à Monsieur le Professeur F. GROS qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger mon travail et a bien voulu m'aider de ses conseils et encouragements tout au long de ce travail.

Je suis très reconnaissante à Monsieur le Professeur J. P. AUBERT d'avoir bien voulu faire partie de ce jury.

Je voudrais exprimer à Monsieur R. VILAGINES toute ma reconnaissance pour avoir dirigé ce travail.

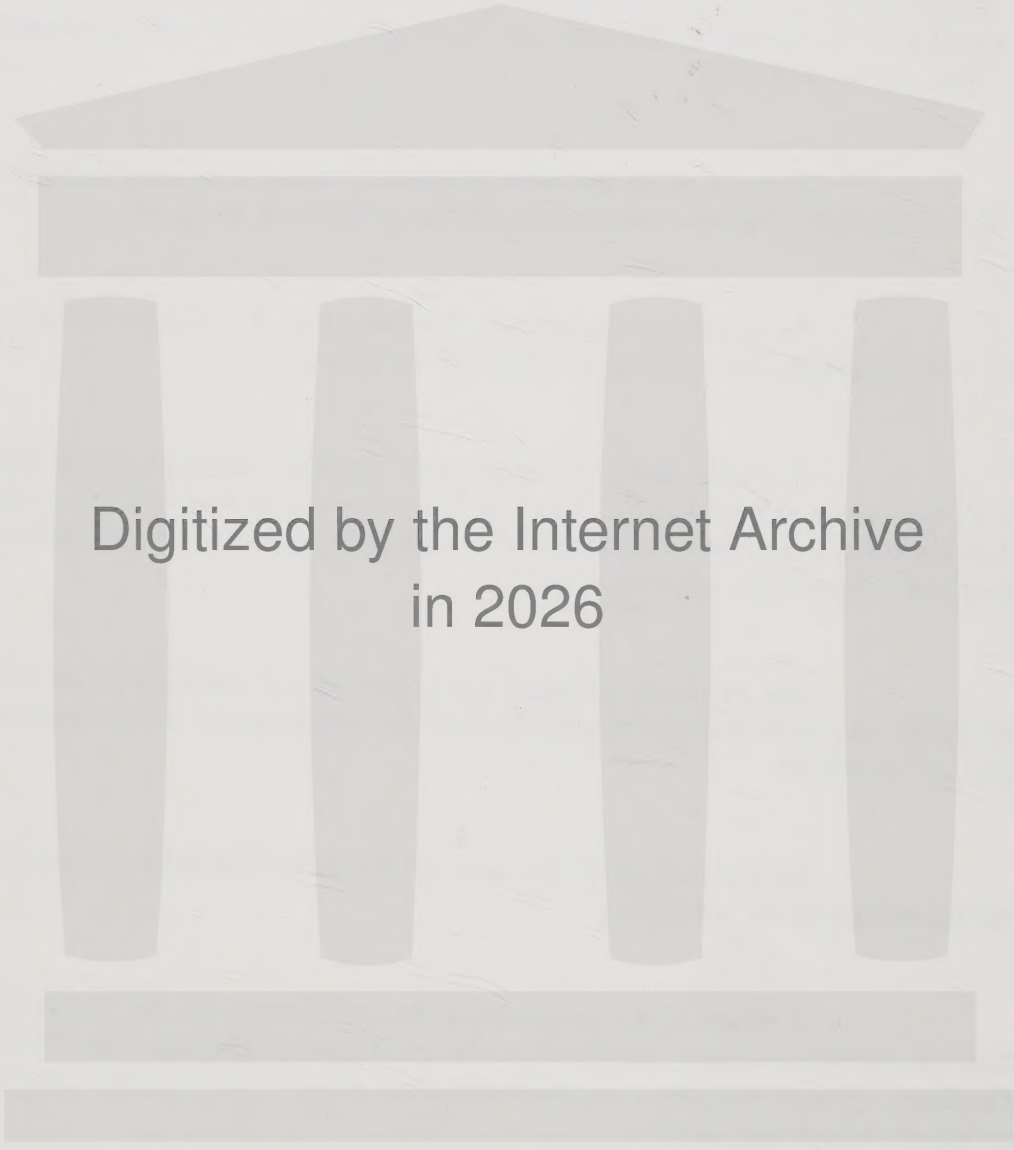
Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur ATANASIU, Chef du Service de la Rage-Recherche à l'Institut Pasteur, qui par son aide efficace, m'a permis de poursuivre ces recherches dans son laboratoire.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Docteur MAURIN qui m'a donné la possibilité de commencer mon travail dans son laboratoire.

Je remercie Monsieur le Docteur SAMSO pour sa collaboration efficace et amicale.

A toutes les personnes du Département de Virologie et plus particulièrement au Service de la Rage-Recherche de l'Institut Pasteur, j'exprime mes remerciements pour leur intérêt amical et l'aide qu'elles m'ont apportés.

Je ne saurais terminer sans remercier tous mes amis français et étrangers pour le soutien qu'ils m'ont apporté par leurs suggestions ou leurs critiques dans l'élaboration et la rédaction de ce travail.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543920_0036

INTRODUCTION

Les pox virus sont des virus à ADN à développement cytoplasmique. Les virus de ce groupe se présentent sous forme de particules ovoïdes ou rectangulaires (170 à 250 x 300 à 325 mm) contenant un ADN double brin (PM = 160. 10^6 daltons).

L'examen d'une préparation purifiée de virus de la vaccine au microscope électronique, après coloration négative, montre la présence de deux types de particules : les formes "M" (80%) muriformes à épaississement central caractéristique, et les formes "C" (20%) lisses légèrement plus grandes et ne présentent pas d'épaississement central. Les formes"M"et"C"ne seraient que deux aspects différents d'une même particule provoqués par une pénétration plus grande du colorant dans les formes "M" que dans les formes "C".

L'essentiel de nos connaissances sur l'architecture de ces virus est apporté par le modèle proposé par Westerwood (46). Le virion est constitué de deux éléments principaux : une couche protéïque externe polystratifiée et un nucléoïde central en forme de diabolo (Figure N° I).

De l'extérieur vers l'intérieur le revêtement protéïque se compose d'une enveloppe externe et des antigènes solubles extractibles par voie enzymatique sans altérer l'infectiosité du virion. A cette double couche succède le revêtement bosselé responsable de l'aspect muriforme de la forme "M".

Ces "bosses" sont, le plus souvent disposées au hasard à la surface du virus, mais dans certains cas,

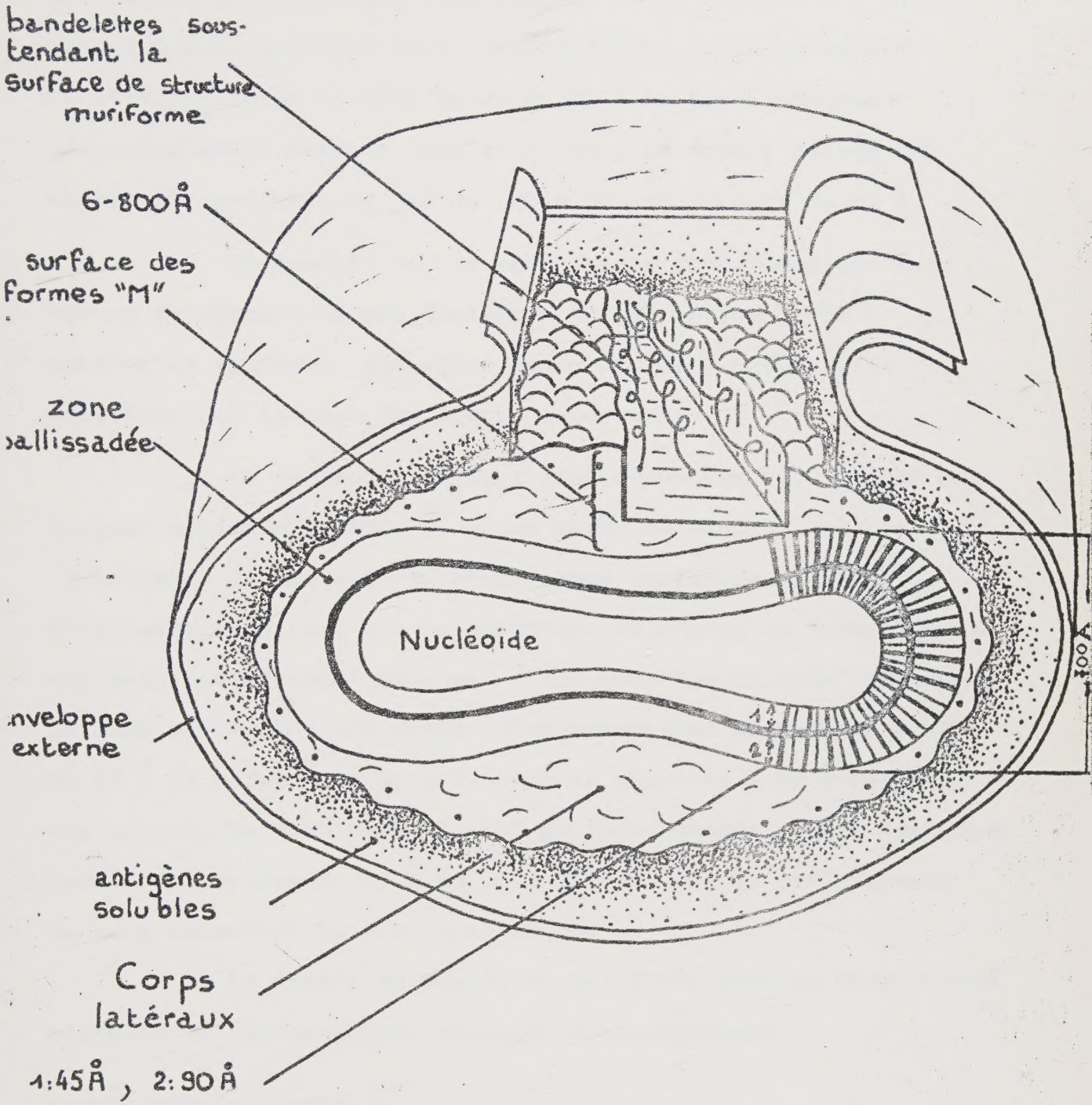


Fig.n° I : Diagramme d'un Pox virus

on a observé un arrangement régulier. Chacune de ces bosses serait constituée par un long filament (tubule) formant une boucle unique. Une étude plus poussée de la structure a montré que ce tubule pourrait être constitué d'un ruban protéïque bicaténaire formé de deux brins de 30 Å de large enroulés hélicoïdalement suivant leur grand axe. La double hélice qui en résulte présente un pas de 120 Å et une largeur de 90 Å.

L'ensemble de ces revêtements protéïques que nous venons de décrire, a une épaisseur totale de 200 à 250 Å environ et recouvre des épaississements de 6 à 800 Å, de structure mal connue, les "corps latéraux".

Le nucléoïde central long d'environ 2000 Å pour une largeur maximale de 1000 Å a une forme de diabolo très caractéristique. Il est entouré d'une coque protéique de 140 Å d'épaisseur environ, qui se subdivise elle-même en deux éléments : une zone "palissadée" externe et une zone "pointillée" interne. La zone palissadée est formée d'un assemblage de tubules creux de 45 Å de large pour 90 Å de long et disposés à 40 Å les uns des autres. La zone "pointillée" qui leur succède serait également formée de tubules de 45 Å de long situés dans le prolongement de ceux composant la zone "palissadée".

Le centre du nucléoïde est formé pour sa part, d'une association DNA-protéines arrangés hélicoïdalement.

COMPOSITION CHIMIQUE.

L'ADN représente 5% du poids du virus, les lipides 2%, les phospholipides 2%, le reste est constitué de protéines.

La complexité de la structure des virus pox laisse

présager d'un nombre important d'espèces moléculaires entrant dans la composition de leur édifice protéique. En effet, la dissolution dans un mélange de S.D.S., urée et β mercapto-éthanol a révélé 15 bandes à l'examen électrophorétique en gel de polyacrylamide.

CYCLE DE DEVELOPPEMENT.

Les principaux évènements biochimiques qui conduisent au sein de la cellule infectée du virion parental à sa descendance sont les suivants : pénétration, décapsidation, transcription, traduction et réplication du génome viral puis maturation du virion.

I. PENETRATION : Par phagocytose. Est suivie d'une période de latence variable selon la multiplicité d'infection (30 mn à deux heures).

II. DECAPSIDATION: Son mécanisme intime est mal connu. La décapsidation s'effectue en deux temps :

1°) Perte par la particule virale des parties les plus externes de son environnement protéique sous l'action d'enzymes cellulaires préexistants et libération des nucléoïdes dans le cytoplasme.

2°) Décapsidation proprement dite conduisant à la libération de l'ADN viral dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Cette étape nécessite une synthèse protéine.

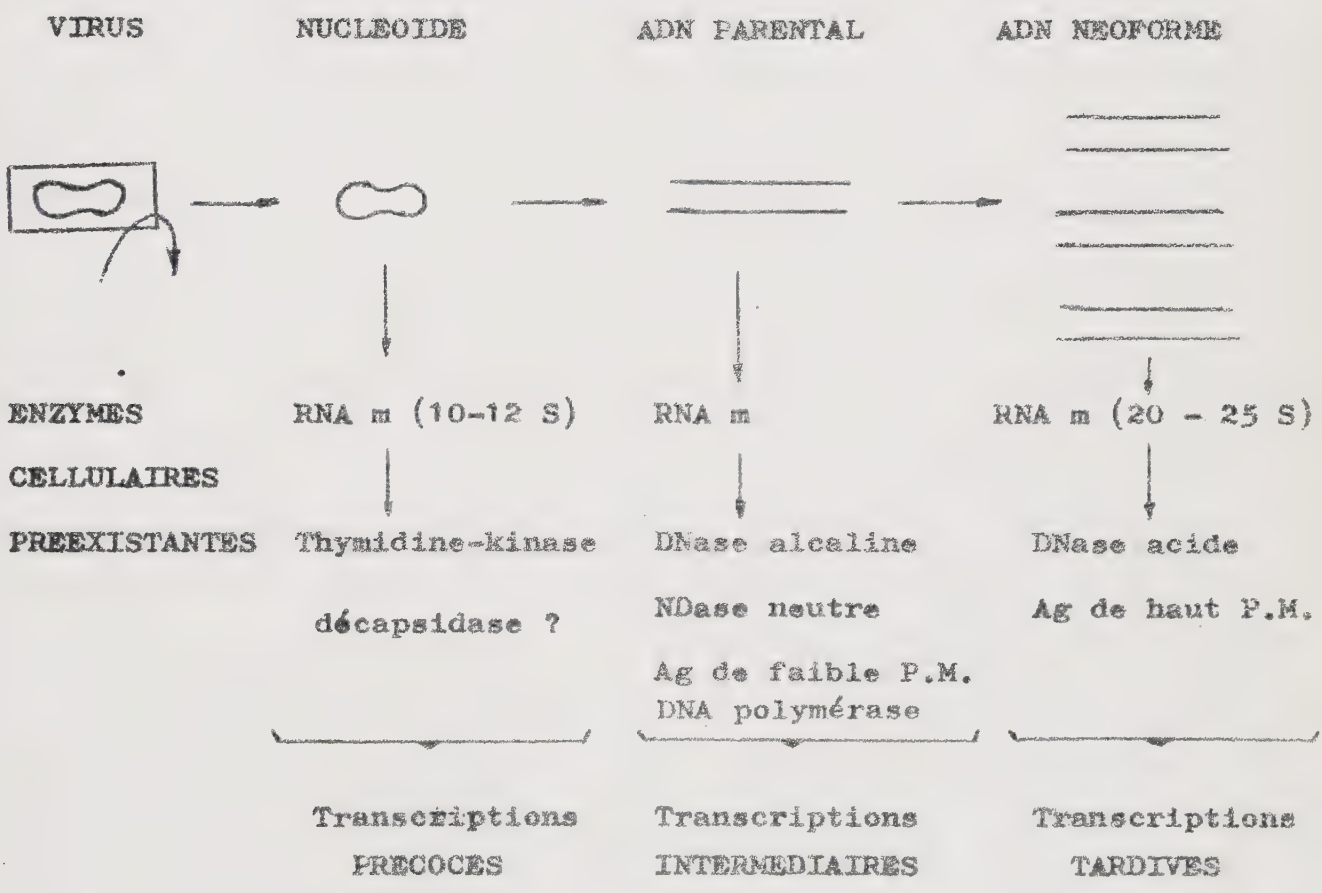
Deux hypothèses permettent d'expliquer les phénomènes intervenant dans cette deuxième étape :

a) Une enzyme spécifique, la "décapsidase" serait codée par le DNA viral encore encapsidé (20).

b) La "décapsidase" serait cette fois d'information cellulaire (15), une protéine structurale du virus (protéine virale inductrice) déréprimerait la synthèse de la "décapsidase" cellulaire.

III. TRANSCRIPTIONS ET TRADUCTIONS :

Nous pouvons les résumer de la façon suivante :



IV. REPLICATION DU DNA VIRAL : Elle débute à 1 h 30 mn après l'inoculation et passe par un maximum à deux heures 30 mn. Elle est complète à 4 h après l'inoculation.

V. MATURATION : L'ADN néosynthétisé est entouré par les protéines de structure pour former un virion complet. Elle est caractérisée par la disparition de la sensiblité à la DNase du DNA viral. Jusqu'à 8 h après inoculation l'ADN est sensible à l'action de la DNase. 30 à 60 mn plus tard, les molécules d'ADN viral sont protégées par les premières protéines de revêtement. Dans les meilleures conditions, seulement la moitié de l'ADN viral synthétisé est incorporée dans les virions de la descendance.

Le virus de la vaccine est porteur de 3 principales activités enzymatiques/"de structure" : Une ARN-polymérase dépendante de l'ADN (20), une nucléoside-triphosphate phosphohydrolase (NTPase) (29) et une protéine-kinase (31). Bien que le rôle de la NTPase dans la cinétique de développement viral soit encore inconnu, sa présence chez de nombreux autres virus (44, 18, 7) laisse supposer d'un rôle important pour cette enzyme dans les premières étapes de la réplication virale. Par analogie avec le rôle mieux connu des ATPases des mammifères (36), Vilaginès et coll. (44) ont formulé l'hypothèse suivant laquelle les ATPases virales joueraient le rôle de transporteur d'ions "activant" la particule virale dès son arrivée dans un environnement physiologique favorable, par échanges d'ions nécessaires soit aux premières étapes biochimiques de son développement, soit à sa décapsidation. Le corollaire à cette hypothèse est que tout virus à environnement protéique complexe, porteur ou non d'un équipement enzymatique nécessaire aux premières étapes de sa réplication, devrait être porteur d'une NTPase. Il nous est apparu intéressant d'entreprendre la vérification de ce corollaire en utilisant un virus du

même sous-groupe que le virus de la vaccine : le virus de la variole du lapin (RP) isolé en 1942 , par Jansen (14). De plus, la présence d'activités enzymatiques identiques dans les cellules ayant servi à produire ce virus (2), les travaux de Joklik (16) et de Tan et coll. (39), qui ont montré que diverses activités enzymatiques d'origine cellulaire pouvaient être associées à des particules virales, posaient la question de savoir dans quelle mesure une activité NTPasique d'origine cellulaire n'était pas susceptible de s'adsorber sur une particule virale. La forte densité du RP (1,29 g/cm3), très supérieure à celle des débris cellulaires porteurs d'activité NTPase (2), devait pouvoir permettre de nous en assurer si toutefois l'inactivation préalable "in vitro" des activités enzymatiques associées au RP se révélait possible.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Cellules :

$BHK_{21}C_{13}$, provenance : "Centro Panamericano de Zoonosis" Argentine.

Milieux :

- MEM (Minimum Essential Medium) Eagle GIBCO (Grand Island Biological Company, New-York), modifié par addition de 2,5% d'hydrolysat de lactalbumine (Difco), U.S.A., et d'extrait de levure (Yestolate), (Difco), U.S.A..
- Eagle, Institut Pasteur, Paris.
- Hanks, Institut Pasteur, Paris.

Sérum :

- Sérum normal de veau, Sorga (Paris).

Antibiotiques :

- Streptomycine ..... 0,1 g
- Pénicilline ..... 100 000 U
- Colimycine ..... 100 000 U
- Erythromycine ..... 0,01 g

(concentrations finales par litre de milieu)

Glutamine : 0,292g (concentration finale par litre de milieu).

Trypsine : Solution à 2%, (Institut Pasteur).

Virus : Virus de la variole du lapin (R.P.), souche Utrecht (don du Dr F. FENNER, Canberra, Australie).

Produits radioactifs - Scintillants.

Mise à part la Thymidine-H^3 (CEA Saclay, France), les molécules marquées que nous avons utilisées nous ont été fournies par The Radiochemical Centre, Amersham Buckinghamshire, Angleterre.

- Adénosine - 2 - H 3-5' Triphosphate, Ammonium Salt activité spécifique : 500 mCi/mM
- Guanosine - 8 - H 3-5' Triphosphate, Ammonium Salt activité spécifique : 8 Ci/mM
- Cytidine - 5 - H 3-5' Triphosphate Ammonium Salt activité spécifique : 3,6 Ci/mM
- Uridine - 5 - H 3-5' Triphosphate Sodium Salt activité spécifique : 1 Ci/mM
- Deoxyadénosine - 8 - H 3-5' Triphosphate Ammonium Salt activité spécifique : 4,1 Ci/mM
- Deoxyguanosine - 8 - H 3-5' Triphosphate Ammonium Salt activité spécifique : 4 Ci/mM
- Deoxycytidine - 5 - H 3-5' Triphosphate Ammonium Salt activité spécifique : 9,3 Ci/mM
- Adénosine - 5' - Triphosphate - Gamma P32, Sodium Salt activité spécifique 610 mCi/mM
- Thymidine méthyle 3H activité spécifique 15 Ci/mM C.E.A., Saclay (France).

La radioactivité acido-insoluble a été déterminée par spectrométrie à scintillation liquide, à l'aide d'un mélange Toluène-Liquifluor (4%) (Prolabo, France; New-England Nuclear, U.S.A.).

La radioactivité en milieu liquide a été déterminée à l'aide de liquide Bray :

P.O.P.	4 g
P.O.P.O.P.	0,2 g
Naphtalène	60 g
Glycol éthylénique	20 g
Ethanol	100 ml
Dioxane ..... q.s.p.	1 000 ml

Produits non radioactifs.

- Acide chlorhydrique (Prolabo, France)
- Acide formique " "
- Acide trichloroacétique (TCA) " "
- Chlorure de calcium (Merck, Allemagne)
- Chlorure de magnésium " "
- Chlorure de manganèse " "
- Chlorure de potassium " "
- Chlorure de lithium " "
- Chlorure de sodium " "
- Sulfate de magnésium " "
- Sulfate de protamine (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Sucrose Density Gradient Grade (Ribonuclease free) (Schwarz/Mann, New-York)
- Agarose Seakem (Marine Colloïds Inc. U.S.A.)

- Fréon "113" Trichloro-trifluoroéthane (Shell Co., U.S.A.)

- p-Nitrophénylphosphate (PNP) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)

- Adénosine triphosphate (ATP) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)

- Adénosine diphosphate (ADP) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)

- Adénosine monophosphate (AMP) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)

- Adénosine monophosphate cyclique : 3°-5° (Sigma Chemical Co., U.S.A.)

- Tris (Tris-hydroxyméthyl-amino méthane) (Merck, Allemagne)

- Serumalbumine bovine, Fraction N°5, 96-99% albumine (Sigma Chemical Co., U.S.A.)

- DNase I (Free of Ribonuclease) de pancréas bovin (Sigma Chemical Co., U.S.A.)

- Détergent non ionique Nonidet P-40 (Shell Co.).

Tampons.

- Tris 0,1M : ajusté à pH = 8,0 à l'aide d'HCL N.

- RSB 10 x Réticulocyte standard buffer

Solution mère 10 fois concentrée :

Tris ..... 12,11 g

KCl ..... 7,45 g

$Mg\ Cl_2, 6\ H_2O$ ..... 3,04 g

H_2O distillée q.s.p; ..... 1 000 ml

Ajusté à pH = 7,4 avec HCl N

Utilisé après dilution au 1/10ème

TAMPON PHOSPHATE 1M pH = 7,2

$Na_2\ HPO_4$ 1M ($\simeq$ 614 ml)

$Na\ H_2PO_4$ 1M ($\simeq$ 386 ml)

Mélanger dans ces proportions et ajuster à pH = 7,2

TAMPON ELECTROPHORESE 0,1M pH = 7,2

Tampon phosphate 1M ..... 100 ml

SDS (dodécylsulfate de Na).. 1 g

Eau distillée q.s.p..... 1000 ml

TAMPON DE DIALYSE

Tampon phosphate 1M (pH = 7,2)... 5 ml

S.D.S. 10% P/V ..... 10 ml

Urée ..... 30 g

Eau distillée q.s.p..... 1 000ml

METHODES

Cultures cellulaires.

Le milieu d'une culture de 24 heures de cellules en monocouche en boîte de Roux (Verrerie "Brosse", Lille), (50×10^6 cellules) est éliminé et remplacé par 5 ml de solution de tryp-

sine. Après 10 minutes à la température du laboratoire, les cellules sont mises en suspension homogène par forte agitation dans 10 ml de milieu de culture renfermant 10% de sérum de veau.

Cette suspension est répartie dans deux nouvelles boîtes de Roux. Chaque boîte reçoit ensuite 95 ml de milieu de culture (MEM 10% de sérum de veau, 10 ml de solution de glutamine et 10 ml de solution d'antibiotiques 100 x), puis est incubée à +37°C. Dans ces conditions les tapis cellulaires sont confluents en 24 heures.

L'absence de mycoplasmes est vérifiée tous les trois repiquages suivant la technique décrite par Bonissol et coll., (5). Cette technique peut se résumer comme suit : 10^6 cellules sont mises en suspension dans 2ml de milieu sans antibiotique. 0,2 ml de suspension est ensemencé dans 2 ml de bouillon. Après 4 jours d'incubation à 37°C, 4 boîtes de Pétri de gélose nutritive sont ensemencées à raison de 0,2 ml de bouillon par boîte. La moitié de ces géloses est incubée à la même température dans une atmosphère d'azote renfermant 10% de CO_2.

Préparation du stock de virus.

Les stocks de virus ont été préparés à partir de cultures cellulaires. (cellules $BHK_{21}C_{13}$)

6×10^8 cellules sont infectées par 0,1 ml d'une suspension de virus de la variole du lapin (multiplicité d'infection : 5 à 10 unités formant plage (PFU) par cellule).

Après une heure d'adsorption à 37°C, on ajoute un milieu de culture dans lequel le sérum de veau a été remplacé par de la sérumalbumine bovine (S.A.B.) 3%. Lors de la préparation de virus marqué, on ajoute au milieu de la thymidine

tritiée (1µ Ci/ml de milieu - activité spécifique : 15 Ci/mM). L'ensemble est porté à 37°C. 24 heures après inoculation le surnageant est centrifugé (5 mn à 1.300 xg) afin de récupérer les cellules en suspension. Le tapis cellulaire est trypsiné à la température du laboratoire (trypsine diluée de moitié avec du milieu de Hanks). Les cellules sont récupérées par centrifugation (5 mn à 1.300 x g) et additionnées à celles du surnageant. Le culot cellulaire est lavé par resuspension dans 15 ml de Tris pH = 8,0 et, après centrifugation (5 mn à 1.300 x g), les cellules sont ensuite resuspendues dans 7,5ml de RBS où elles sont maintenues durant 10 mn à 0°C. Elles sont ensuite broyées à l'aide de l'homogénéisateur de Dounce (Kontes, C.O.) (15 à 20 coups), et les noyaux sont éliminés par centrifugation (5 mn à 500 x g).

Les traces d'ADN cellulaire sont éliminées du surnageant (extrait cytoplasmique) par traitement à la DNAse (20µg/ml, 1 heure à 20°C et 30 mn à 37°C) en présence de $MgSO_4$, 5.10^{-3}M.

L'extrait cytoplasmique reçoit ensuite 1/3 de son volume de Fréon 113. Après homogénéisation à l'aide de l'appareil de Dounce (20 coups), les débris sont éliminés par centrifugation (5 mn à 1.300 x g).

Le surnageant contenant le virus est réparti en fractions de 5 ml. Après purification par centrifugation à travers une solution de saccharose à 36% P/V (Tris 0,01 M, pH = 8,0) en tubes de 39 ml, Rotor Spinco SW27 (96 300 x g, 1 heure, 4°C), les culots sont resuspendus dans un volume final de 2ml (Tris 0,1M, pH = 8,0) et homogénéisés par traitement aux ultrasons (21 KHz) pendant 1 minute.

La suspension virale est ensuite déposée à la surface de deux gradients de saccharose 5 - 20 % (Tris 0,01M, pH = 8,0, tubes de 16 ml, Rotor Spinco SW27). Les gradients sont centrifugés (96.300 x g, 2 heures, 4°C) puis collectés. Infectiosité, densité optique et radioactivité sont déterminées sur chaque fraction.

Après élimination du saccharose par centrifugation (100.000 g, 1h, 4°C) et resuspension dans du Tris HCl 0,1 M, pH = 8,0. La concentration en protéines virales a été déterminés par la technique de Lowry (25) dans le mélange des fractions du pic renfermant l'infectiosité.

Schéma général de la purification du R.P.

12 boîtes de Roux ($6\ 10^8$ cell. infectées)

Liquide surnageant

Fugation- C - 5 mn à 1.300 x g

ageant
iminé)

Culot

Trypsination

(10 mn à la température du laboratoire)

- Centrifugation 5mn à 1.300 x g

Culot

+ 15 ml de Tris 0,1M, pH=8,0

- Centrifugation 5 mn à 1.300 x g

Surnageant

éliminé

Culot

+ 7,5 ml RSB

10 mn à 0°C

Dounce (15 à 20 coups)

- Centrifugation 5 mn à 500 x g

Culot

éliminé

Surnageant

+ DNAse (20µg/ml)

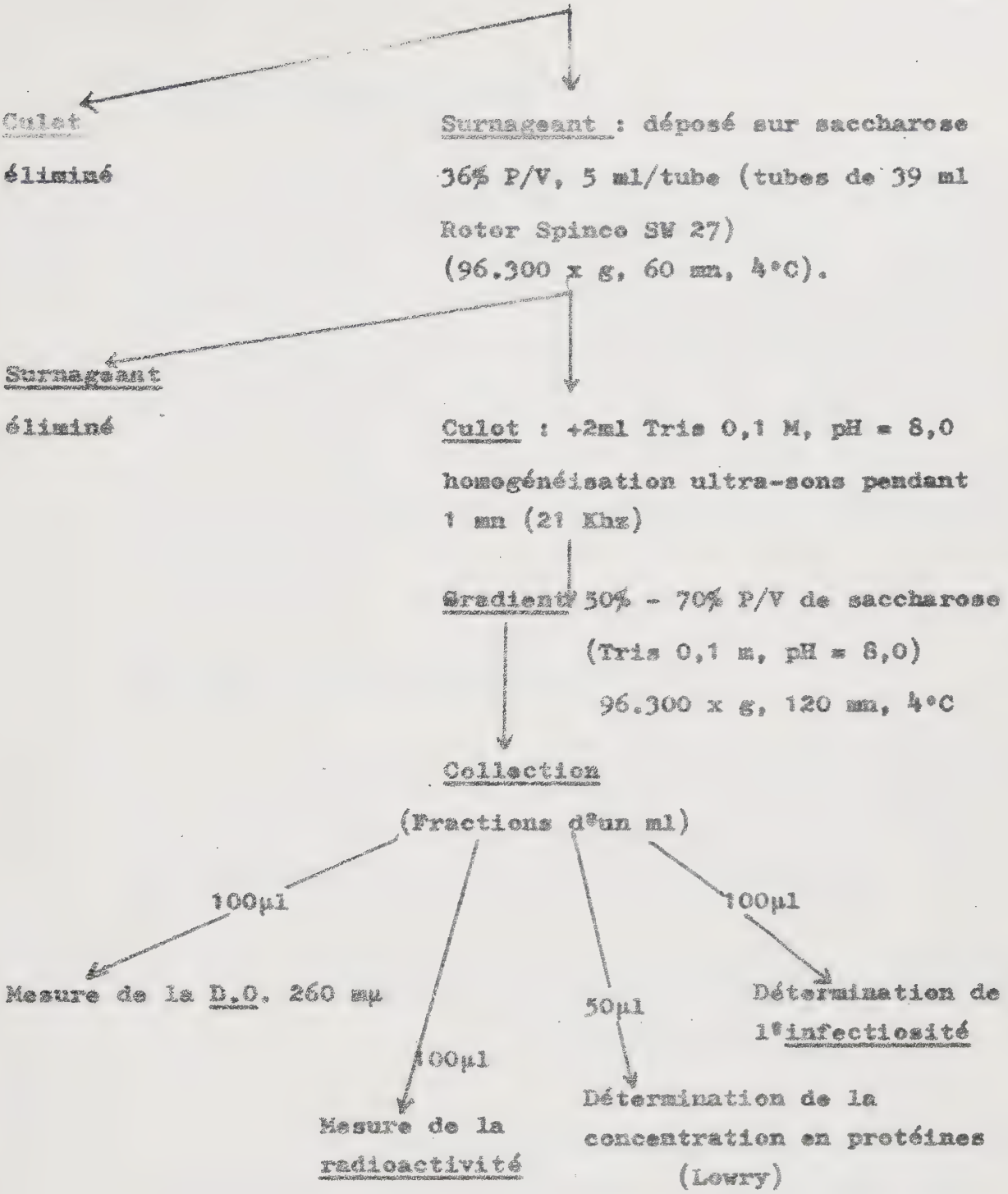
+ $MgSO_4$ concentration finale 5.10^{-3}M

1 heure à 20°C + 30 mn à 37°C

+ **Fréon 113** (1/3 du volume)

Dounce (20 coups)

- Centrifugation 5 mn à 1.300 x g



Mesure de la densité optique (D.O.)

Détermination sur des dilutions 1/10, à 260mµ à l'aide d'un spectrophotomètre Beckmann (Modèle DU.II).

Mesure de la radioactivité.

Des aliquotes de 0,5 ml de chaque fraction du gradient reçoivent 3 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (T.C.A.) 10% P/V. Après 30 mn à 4°C, les précipités sont récupérés par filtration sur filtre Whatman GF/C, lavés par 5 ml de TCA 10%, puis par 2 fois 5 ml d'alcool absolu.

Après séchage des filtres (60°C, 2 h) la radioactivité de chaque filtre est déterminée par spectrométrie à scintillation.

Détermination de l'infectiosité.

Le titre infectieux a été déterminé par inoculation de la membrane chorioallantoïdienne de l'oeuf embryonné et par la méthode des plages sur cellules $BHK_{21}C_{13}$.

1°) Inoculation de la membrane chorio-allantoïdienne d'oeufs embryonnés.

La suspension virale est diluée suivant les puissances de 10 à l'aide du liquide de Hanks. Chaque dilution est inoculée à la surface de 5 membranes chorio-allantoïdiennes d'oeufs embryonnés de 11 jours, à raison de 0,25 ml par oeuf (45). Le dénombrement des plages est effectué après 48 heures d'incubation à 37°C. Le titre est exprimé en Pocks Forming Units/ml (PoFU/ml).

2°) Méthode des plages.

Nous avons utilisé des boîtes de Pétri Falcon

(35 x 10 mm, U.S.A.). Chaque boîte reçoit 2 ml de suspension cellulaire ($BHK_{21}C_{13}$) 200.000 cellules /ml dans du milieu de culture (MEM). Après 24 h d'incubation à 37°C (en caisson Lwoff contenant un mélange gazeux de 95% d'air et 5% de CO_2), le milieu est éliminé et les cellules sont inoculées à l'aide de 0,1 ml de dilution virale (effectuées suivant les puissances de 10 dans du liquide de Hanks) à raison de 5 boîtes par dilution. Après une heure d'adsorption à 37°C l'inoculum est éliminé et les cellules sont recouvertes par 2 ml de milieu gélifié (un volume d'agarose 1,2% et un volume de milieu de Eagle deux fois concentré). Après 48 h d'incubation dans un caisson Lwoff dans les conditions antérieurement décrites, les cellules sont fixées par addition de 3ml de TCA 5% par boîte. Après élimination de la gélose, les cellules sont colorées durant 5 mn par une solution de bleu de toluidine à 0,2%. Les tapis cellulaires sont ensuite lavés et les plages dénombrées. Le titre infectieux est exprimé en PFU/ml.

Préparation de nucléocapsides du virus de la variole du lapin

(Core du R.P.)

I. PRINCIPE.

Le virus de la variole du lapin, appartenant au groupe des virus Pox, possède une enveloppe lipoprotéique susceptible d'être éliminée par divers détergents. Afin d'obtenir des nucléocapsides virales nous avons utilisé le détergent non ionique Nonidet P40 (NP40) en présence de β mercaptoéthanol (12,10,21,19).

II. TECHNIQUE .

Les nucléocapsides de R.P., sont préparées à partir de virus purifié, marqué à la thymidine tritiée (voir préparation du stock de virus et purification) titrant 2.10^8 PFU/ml (30.000 cpm/ml).

0,5 ml de virus sont traités par le Nonidet P_{40} (concentration finale 0,5% V/V) et le mercaptoéthanol (concentration finale $7,5. 10^{-2}$ M) puis incubés 30 mn à 37°C. Un témoin où le Nonidet P_{40} et le mercaptoéthanol ont été remplacés par du Tris 0,1M pH = 8 est préparé dans les mêmes conditions.

A la fin du temps d'incubation, les suspensions virales traitées et non traitées sont déposées à la surface de deux gradients saccharose (25-45% P/V Tris 0,05M pH = 8; mercaptoéthanol $7,5. 10^{-3}$M) reposant sur un coussin de 5 ml de saccharose 70% P/V. Après centrifugation (23.000 g, 42 mn, 5°C) et collection, activité ATPase et radioactivité ont été déterminées sur chaque fraction.

ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

I. PRINCIPE.

De façon générale, l'électrophorèse permet d'étudier la migration d'une macromolécule sous l'effet d'un champ électrique dans un solvant donné. L'une des applications de cette technique est l'électrophorèse en présence de détergent ionique comme le SDS. En présence de ce dernier, les protéines se déna-

turent et fixent une grande quantité de SDS (fortement ionisé) proportionnelle à la longueur de la chaîne peptidique, donc à sa masse moléculaire.

Ainsi, la chaîne peptidique, sous l'effet du champ électrique agissant sur les ions qu'elle a fixés, entre en mouvement, mais ce mouvement est entravé par le frottement de la molécule sur le gel. Ces deux effets se compensent et Vinuela et Maizel ont démontré que cette compensation aboutit à la loi suivante : la distance parcourue sur gel d'acrylamide sous l'influence d'une champ électrique par des protéines dénaturées par le SDS est fonction linéaire du log. de la masse moléculaire des protéines.

II. TECHNIQUE.

Composition des gels.

Les gels de 13 cm de longueur et 0,5 cm de diamètre sont composés de :

Acrylamide	8,5%
Bis acrylamide	0,25%
Tampon phosphate pH = 7,2	0,1 M
Urée	1 M
Dodécylsufate de sodium ..... (SDS)	0,1%
Persulfate d'ammonium	0,075%
Temed (N, N, N', N' tétra- méthylène diamine).....	0,05%

1°) Préparation des échantillons à analyser.

A 300 µl d'une solution de protéines (≃ 100 µg) nous avons ajouté :

20 µl de S.D.S. 25% P/V

20 µl d'urée 10 M

20 µl de dithiothreitol (DTT) 1,7 M

Le mélange est ensuite incubé 45 mn à 37°C, puis 2 mn à 100°C. Chaque échantillon est alors dialysé pendant 12 h contre le tampon de dialyse et chauffé 45 mn à 60°C pour dissocier les agrégats.

Des aliquotes de 200 µl sont déposées au sommet des gels.

2°) Préélectrophorèse :

Afin d'éliminer les charges ioniques contenues dans les gels ceux-ci sont soumis à une pré-électrophorèse avec le tampon d'électrophorèse, pendant 4 heures à raison de 2 mA/gel.

3°) Electrophorèse :

On charge les gels avec 200 µl de la solution préparée (cf : II, I) (≃ 50 µg de protéine).

L'électrophorèse est effectuée à raison de 2mA/gel pendant 20 mn puis 5mA/gel pendant 15 à 18 heures.

4°) Récupération des gels :

Les gels sont extirpés des tubes avec une aiguille à eau sous pression.

5°) Fixation des gels :

Les gels sont fixés une heure par du TCA 12,5% (P/V).

6°) Coloration des gels :

Pendant une heure dans le mélange :

Alcool méthylique ..... 150 ml

Eau distillée ..... 65 ml

Solution aqueuse de bleu de coomasie 1% ..... 85 ml

Acide acétique ..... 30 ml

7°) Décoloration :

Par l'acide acétique en solution aqueuse à 7,5% (V/V) jusqu'à transparence du gel.

8°) Lecture au photomètre intégrateur.

La lecture est effectuée à l'aide du photomètre intégrateur PHI 7.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE

La séparation de nucléosides mono, di et triphosphates a été effectuée suivant la technique modifiée de J.F. Morrison (27). Cette méthode peut se résumer comme suit :

Le mélange de réaction optimum contient :

Virus 2 µg (protéines virales); β mercaptoéthanol 40 mM; adénosine triphosphate ^{3}H 20 µM (radioactivité spécifique 0,25 µ Ci/n mole); Chlorure de magnésium 1 m M; Tris 60 m M pH = 8,0, dans un volume final de 250 µl.

Un "blanc" où le virus a été remplacé par 10 µl d'eau distillée est préparé dans les mêmes conditions.

Après une heure d'incubation à 37°C, 20 µl du mélange de réaction et 20 µl du "blanc" sont déposés à 2,5 cm de distance l'un de l'autre, au sommet d'un papier Whatman de 81 DEAE (diethylamino-éthyl-cellulose).

Après séchage, 5 µl d'un mélange à 16 mM chacun d'ATP, d'ADP et d'AMP sont, en vue d'assurer le repérage en lumière U.V., superposés sur les premières taches, puis séchés.

La chromatographie descendante est effectuée à l'aide de formiate d'ammonium 0,6 M pH = 3,1. Après séchage, les taches d'ATP, ADP et AMP sont repérées par examen en lumière U.V. (254 mµ), découpées, et comptées dans un mélange scintillant à base de toluène et liquifluor. Le nombre respectif de mµ moles d'ATP H^3, d'ADP H^3 est calculé à partir du pourcentage du nombre de C.P.M., blanc déduit, de chacun d'entre eux par rapport au nombre total de C.P.M.

DOSAGE DE PROTEINE KINASE

I. PRINCIPE.

L'activité protéine-kinase est capable de transférer le phosphore " γ " d'une molécule d'ATP sur certaines protéines. La réaction de phosphorylation de protéines peut être mise en évidence en dosant l'incorporation du phosphate radioactif dans les protéines, acido-insolubles à partir de l'ATP $\gamma\,^{32}P$.

Ce phénomène pourrait s'exprimer de la façon suivante :

$$ATP\,\gamma\,^{32}P + \text{protéine OH} \rightleftharpoons ADP + \text{protéine}\,^{32}P$$

II. TECHNIQUE DE DETERMINATION.

L'activité protéine-kinase est déterminée selon la technique de Strand et August (38) sur un échantillon provenant d'un stock de virus R.P. contenant 4. 10^7 PFU/ml, 1,5 unités de densité optique et 250 µg de protéines virales par ml.

Le mélange réactionnel comprend : adénosine triphosphate gamma ^{32}P, 50 c.p.m. par picomole, 0,025 mM; tampon Tris-maléate : 25 mM, pH = 8; chlorure de magnésium : 21 m M; Nonidet P_{40} : 0,015% P/V; dithiothreitol : 10 m M; sulfate de protamine : 50 µg; adénosine monophosphate cyclique : 3'-5', 1 µM; virus 40 µl (10 µg de protéines virales); dans un volume final de 200 µl.

Pour déterminer l'activité enzymatique en fonction du temps, nous avons utilisé pour chaque point deux tubes : un tube réactionnel contenant le mélange déjà décrit et un tube témoin où le virus est remplacé par 40 µl d'eau.

Ces tubes sont incubés à 37°C au B.M.. Pour arrêter la réaction les tubes reçoivent 0,3 ml d'acide trichloracétique 10% P/V et sont placés immédiatement dans la glace fondante.

Après centrifugation 30 mn, 1.000 x g à 4°C, et élimination du surnageant, le précipité acido-insoluble est dissous par 100 µl de NaOH 0,3N.

La fraction acido-insoluble est précipitée à nouveau par 4 ml d'acide trichloroacétique (T.C.A.) 5% P/V contenant 0,02M de pyrophosphate de sodium (Na -PPi). Après 30 mn à 0°C, le précipité est récupéré sur filtre Whatman GF/C et lavé cinq fois par 5 ml de T.C.A. 5% P/V plus 0,02M (Na-PPi).

Après séchage des filtres, la radioactivité de chaque filtre est mesurée et les résultats sont exprimés en ^{32}P incorporé (n moles/mg de protéine).

R E S U L T A T S

CHAPITRE N° I

MISE EN EVIDENCE, ETUDE ET LOCALISATION DE L'ACTIVITE NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE (NTPase) ASSOCIEE AU R.P.

A. PRODUCTION ET PURIFICATION DU VIRUS.

Le virus de la variole du lapin, cultivé sur cellules $BHK_{21}C_{13}$ est purifié par une méthode dérivée de celle de Salzman et coll. (32).

Cette méthode peut se résumer comme suit :

L'extrait cytoplasmique de 5.10^8 cellules infectées est traité au FREON 113 puis purifié par centrifugation à travers une solution de saccharose à 36% P/V (96.300 g; 60 mn, 4°C).

Le culot contenant le virus est repris à l'aide d'un tampon TRIS 0,1 M (pH = 8), et purifié à nouveau par deux centrifugations isopycniques successives en gradient de saccharose 50-70% P/V (96.300 g, 120 mn, 4°C).

La bande virale visible est située dans une zone de densité de ρ = 1,2936 g/cm3 correspondant à la densité du virus.

Après collection des gradients, la densité optique et l'infectiosité sont déterminées sur chaque fraction.

Les résultats (Figure N°II) montrent que la densité optique et l'infectiosité coïncident (37, 44 , 22).

Le virus ainsi purifié a un titre infectieux de 4.10^7 PFU/ml et renferme 200 µg de protéines/ml.

L'examen au microscope électronique de fractions riches en particules virales (Figure N°III), montre deux types de particules identiques à celles décrites par Westwood et coll. (46) : particules "M" "muriformes" (80%) et particules "C" "capsulées" (20%).

La différence observée entre les deux types de particules n'est qu'apparente et ne dépend que de leur degré d'hydratation. En effet, après hydratation, Westwood a montré que les particules "C" sont susceptibles de se transformer en particules "M".

B. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R.P.

De nombreuses activités NTPases ont été trouvées associées à des virions différents (44 , 29 , 7). La présence d'une activité NTPase associée au virus de la vaccine nous a amenée à vérifier si le R.P., appartenant au même sous-groupe, est également porteur de cette activité.

On a donc purifié le virus par des centrifugations isopycniques (cf Chapitre N° I, A). Des aliquotes de différentes fractions de la dernière centrifugation isopycnique ont été incubées avec de l'ATP-^{3}H (cf matériel et méthodes) et les produits de la réaction ont été analysés par chromatographie sur papier, selon la méthode de J.F. Morrison (27).

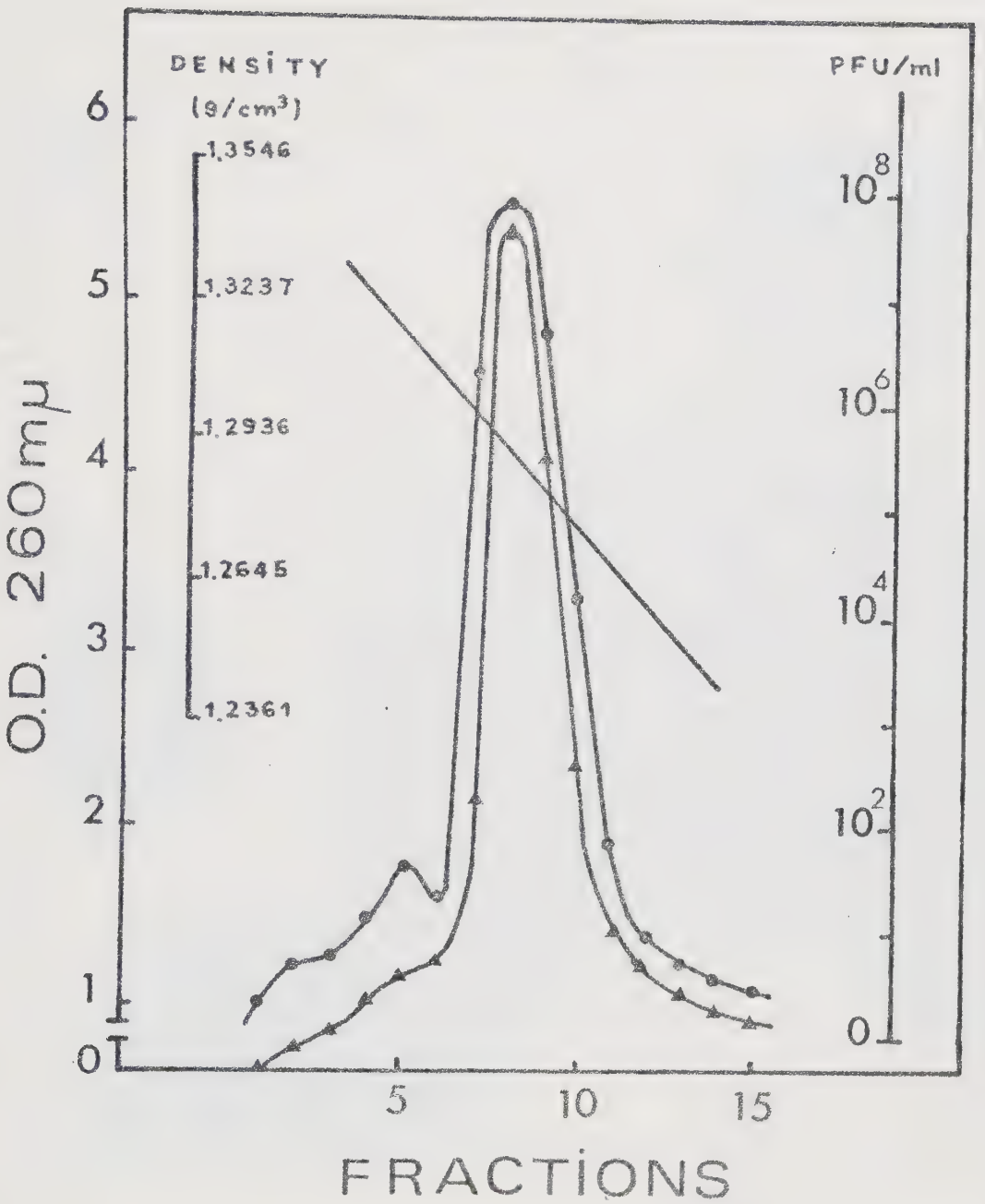


FIGURE N° II : PURIFICATION DU RABBIT POX

Le virus en suspension dans 2 ml de TRIS 0,1 M pH = 8,0 est déposé à la surface d'un gradient de saccharose 30-70% P/V de 28 ml, et centrifugé à 96.300 g durant 120 mn à 4°C dans un rotor SW_{27}.

—●——●— Densité optique à 260 mμ

—▲——▲— Infectiosité déterminée sur membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de poule embryonné.

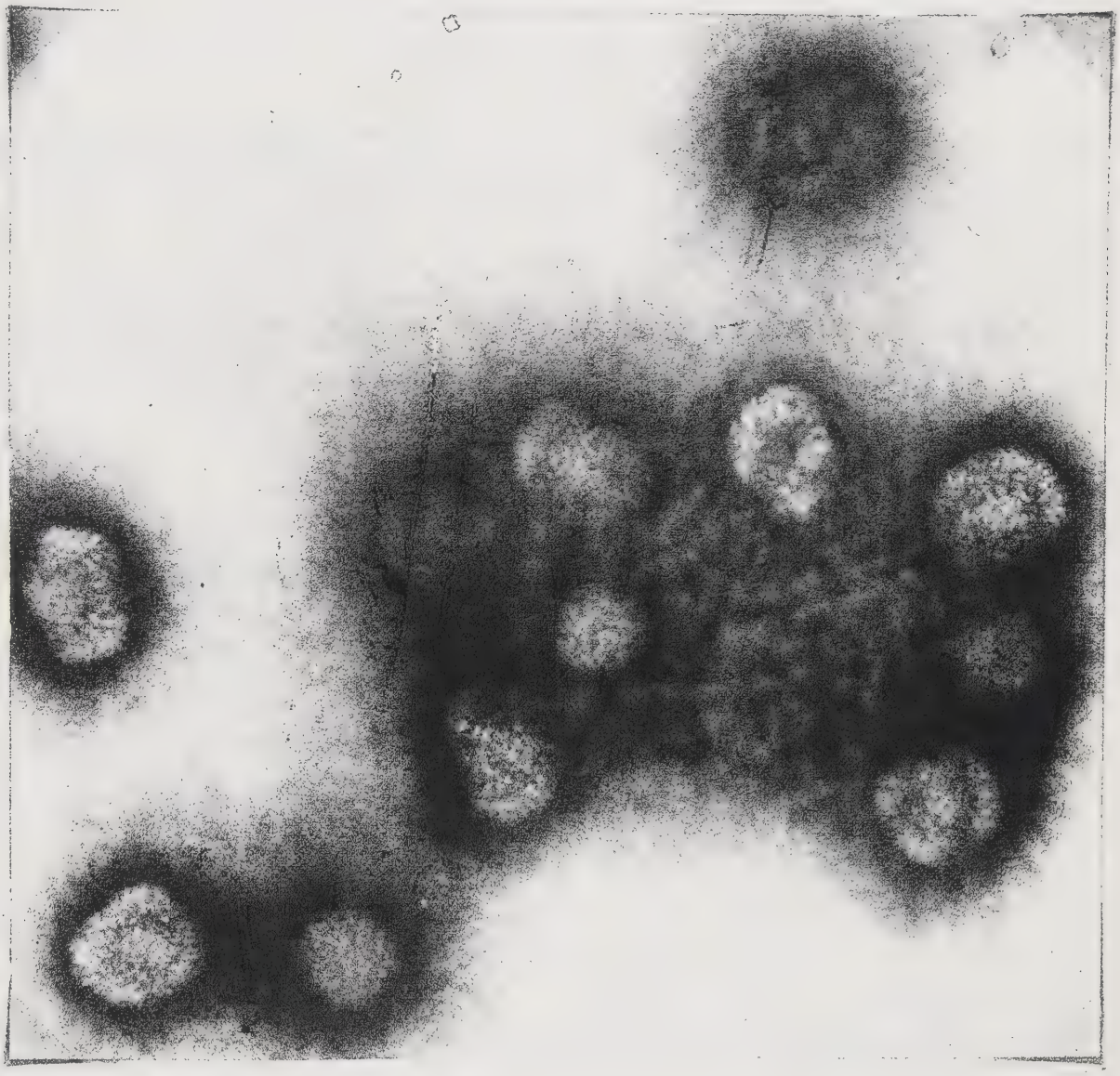


FIGURE N° III : PREPARATION DE RABBIT POX PURIFIE (x 74.000)

Coloration négative par l'acide phosphotungstique. On observe des particules capsulées "C" à côté des particules muriformes "M".

On constate que l'activité NTPase des fractions du gradient coïncide avec la densité optique et l'infectiosité (Figure N°IV).

Ces résultats montrent qu'une activité NTPase est associée au R.P..

C. ETUDE DE L'ACTIVITE NTPase ASSOCIE AU R.P..

Après avoir mis en évidence la présence d'une activité NTPase associée à la particule virale nous avons cherché à déterminer les conditions optimales d'activité de cette enzyme.

a/ ACTION DE IONS DIVALENTS ET MONOVALENTS.

Comme le montre la figure N°V l'activité enzymatique est fortement stimulée par les ions Mg^{++} : l'optimum de concentration étant de 1 m M.

Cette propriété est commune aux ATPases cellulaires (4 , 36 , 42) et virales (7 , 29 , 44).

Comme les ions Mg^{++}, les ions Mn^{++} stimulent l'activité enzymatique, qui présentent deux optimums pour des concentrations de 1 et 4 m M.

A la différence des ATPases mitochondriales (42) cette enzyme n'est que très faiblement stimulée par les ions Ca^{++}.

La figure N°VI montre qu'il existe une synergie entre les trois ions monovalents Li^{+}, K^{+}, Na^{+} et le Mg^{++}. Pour une concentration optimale de Mg^{++}, on observe des optimumns d'activité :

FIGURE N° IV : PURIFICATION DU RABBIT POX ET DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ NTPase ASSOCIÉE A CE VIRUS

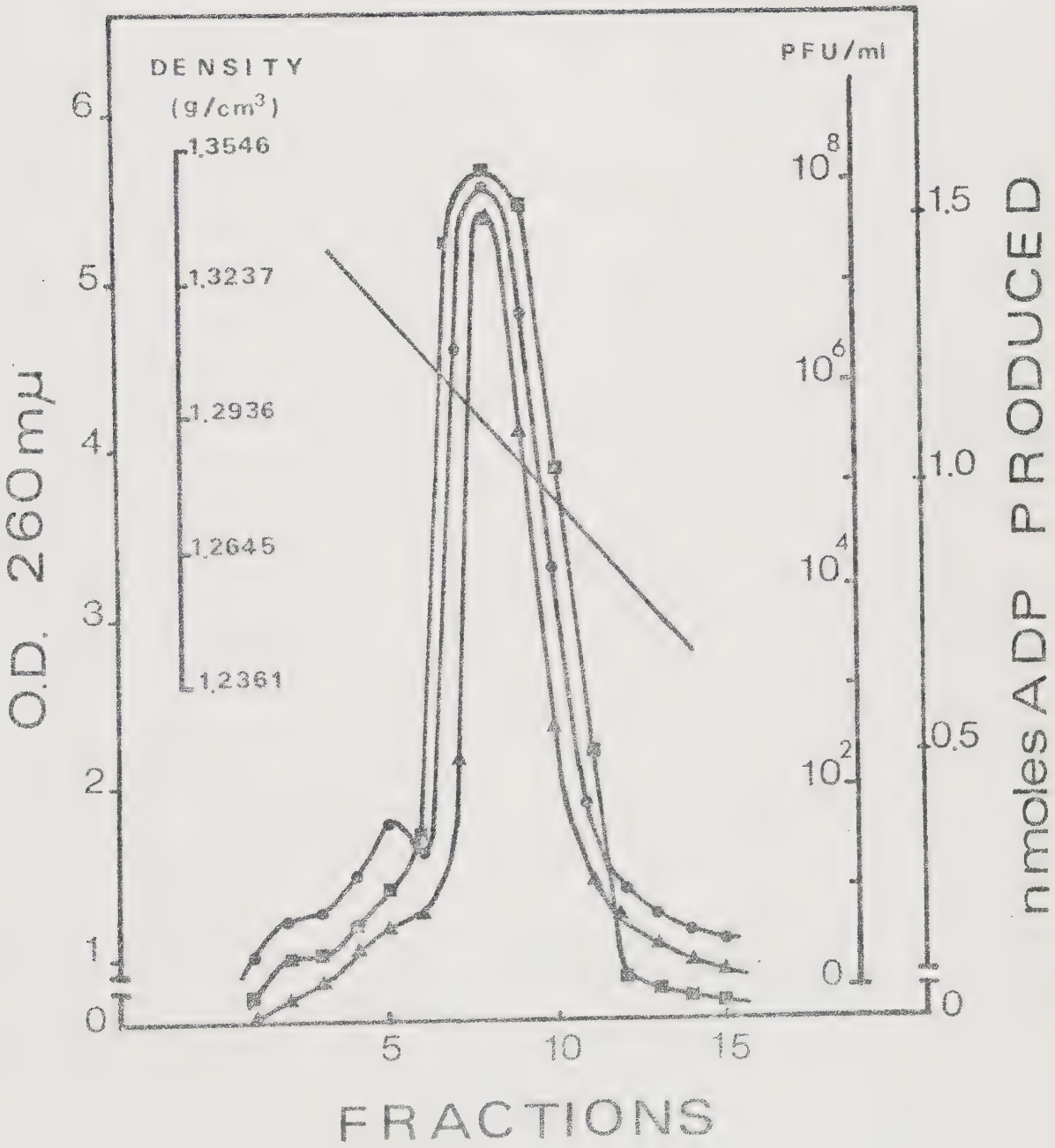
Le virus est traité selon la technique décrite Figure N° II.

—●— Densité optique à 260 mμ

—▲— Infectiosité déterminée sur membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de poule embryonné.

—■— Activité NTPase associée au R.P. déterminée de la façon suivante : 20 μl de chaque fraction sont incubés durant 60 mn à 37°C en présence du mélange (volume final 250 μl) $ATP^{3}H$ 20 μ M (0,25 μ Ci/nanomole), $MgCl_2$ 6 m M; TRIS pH = 8,0 60 m M.

Des échantillons de 20 μl sont dilués par 5 μl d'un mélange froid ATP + ADP + AMP (16 m M chacun), et chromatographiés sur papier WHATMAN DEAE 81/ formiate d'ammonium 0,6 M pH = 3,1. Après séchage les taches d'ATP, d'ADP et d'AMP sont répérées par fluorescence U.V. (254 m μ) puis découpées et comptées dans un mélange toluène-liquifluor. Un témoin est réalisé dans des conditions identiques, à l'exception desprotéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau. Cette valeur est ensuite déduite des valeurs obtenues en présence de protéines virales.


DENSITY
(g/cm³)
1.3546
1.3237
1.2936
1.2645
1.2361
PFU/ml
10⁸
10⁶
10⁴
10²
0
O.D. 260mμ
6
5
4
3
2
1
0
1.5
1.0
0.5
0
n moles ADP PRODUCED
5
10
15
FRACTIONS

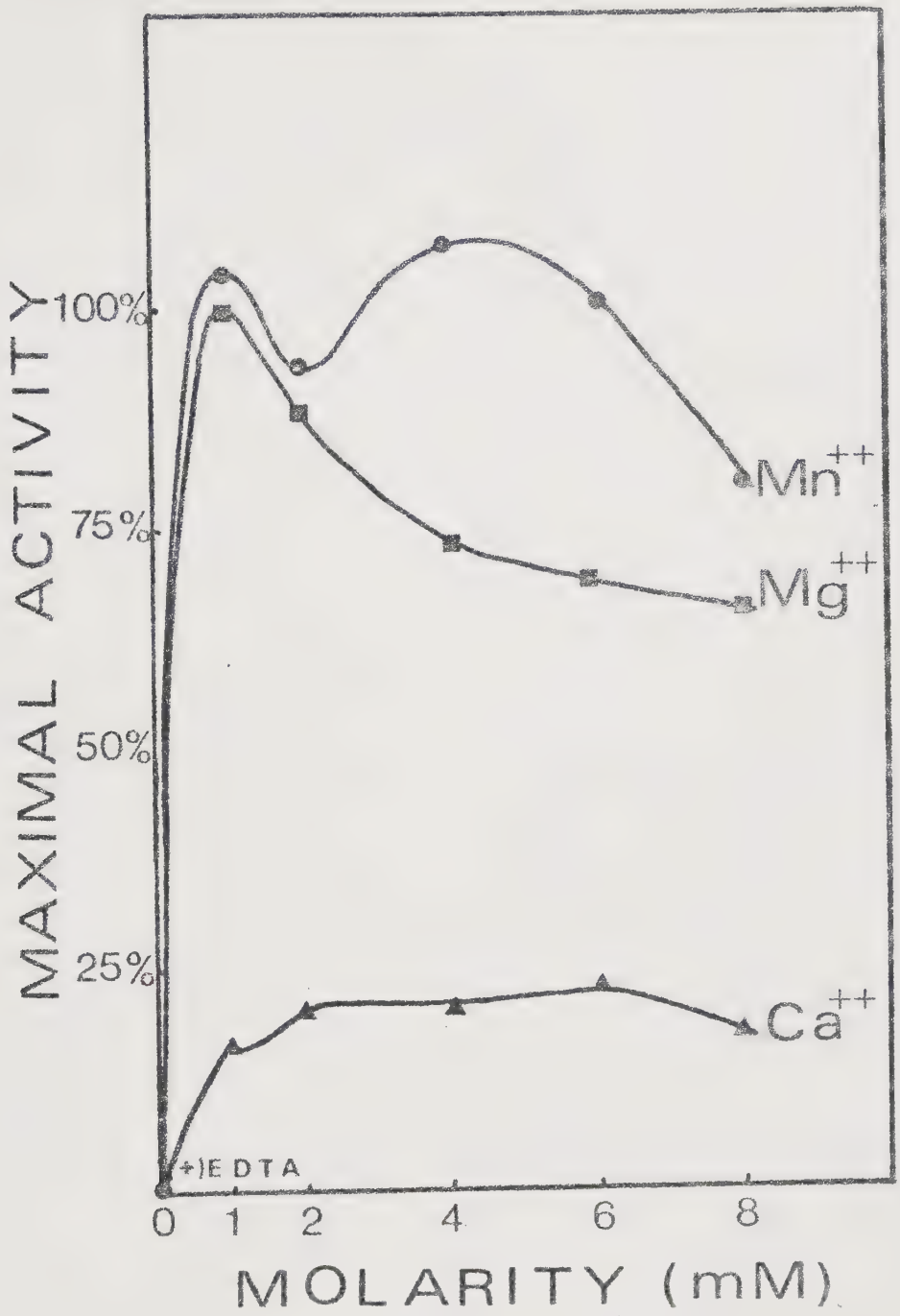


FIGURE N° V : ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R.P. CONCENTRATIONS OPTIMALES DE Mg^{++}, Ca^{++} et Mn^{++}.

2 µg de protéines virales sont incubées à 37°C pendant 120 mn, en présence du mélange suivant (250 µl du volume final) :

$ATP^{3}H$ 20 µ M (0,25 µ Ci/manomole); Mg Cl_2, Mn Cl_2, ou Ca Cl_2 à des concentrations variant de 0 à 8 m M; β mercaptoéthanol 40 m M; TRIS pH =8,0 60 m M. La concentration nulle d'ions divalents est obtenue par l'omission d'ions divalents et l'addition de 50 µ l d'E.D.T.A. 0,1 M. Après incubation les échantillons de 20 µ l sont alors traités selon la technique décrite figure IV.

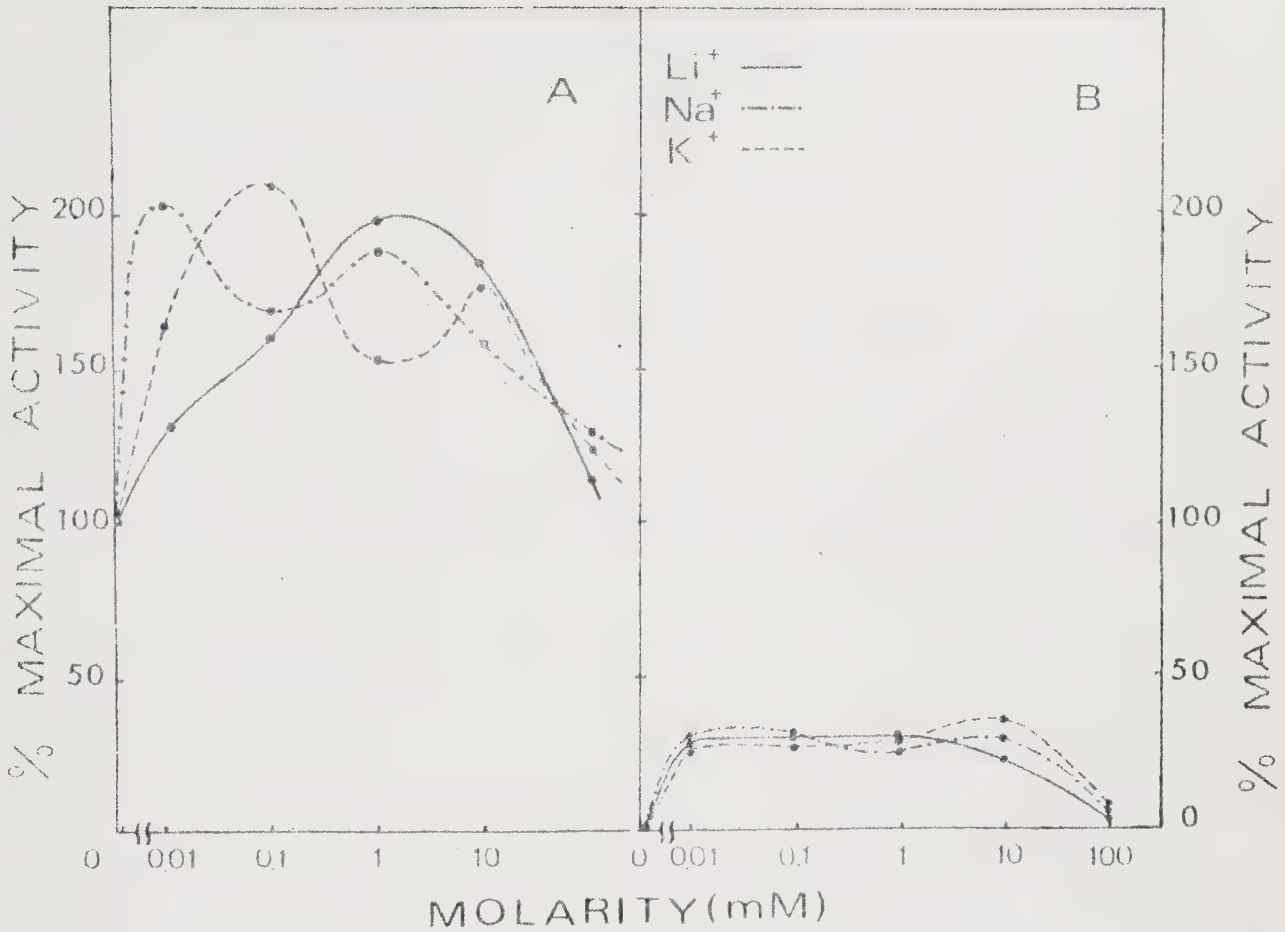


FIGURE VI. ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU F.P. CONCENTRATIONS OPTIMALES DE Li^+; Na^+ et K^+.

A. En présence de $Mg\ Cl_2$ 1 mM

B. En absence de $Mg\ Cl_2$.

2 µg de protéines virales sont incubées à 37°C pendant 120 mn en présence de 250 µl du mélange : ATP ^{3}H 20µ M (0,25 µ Ci/nmole); $Mg\ Cl_2$ absent (B) ou présent (A) à la concentration de 1 m M; Li Cl, Na Cl ou KCl à des concentrations de 0; 0,01; 0,1; 10 ou 100 mM; µmercaptoéthanol 40 m M; TRIS pH = 8,0 50 mM.

Des témoins sont réalisés dans des conditions identiques à l'exception des protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau. Après incubation, des échantillons de 20 µl sont alors traités selon la technique décrite figure N° 14.

Li^+ ———

Na^+ — · — · —

K^+ — — — —

- pour une concentration en Li^+ de 1 m M (1 optimum),

- pour des concentrations en Na^+ de 0,01 m M et 1 m M (deux optimums),

- pour des concentrations en K^+ de 0,1 m M et 10 m M (deux optimums),

Ces résultats montrent que l'activité NTPase associée au R.P. présente de nombreuses analogies avec les autres activités NTPase virales (7 , 29 , 44) et qu'elle se différencie des ATPases cellulaires connues (36 , 4, 42)

b/ EFFET du pH

Comme l'activité NTPase associée au virus de la vaccine (29), celle associée au R.P. présente plusieurs optimums de pH. Dans le cas du R.P., les optimums sont situées à pH = 7 et pH = 8 en tampon TRIS = 0,1M. Le maximum d'activité étant observé à pH = 8 (Figure VII). Ces résultats permettent de penser que deux activités NTPase différentes pourraient être associées au R.P..

c/ CINETIQUE DE PRODUCTION D'ADP.

L'étude cinétique à 37°C de l'activité enzymatique (Figure N° VIII) montre que la production d'ADP est linéaire durant 60 mn.

La légère diminution de la vitesse observée après 60 mn en présence d'un large excès d'ATP, peut être attribuée à la dénaturation thermique de l'enzyme.

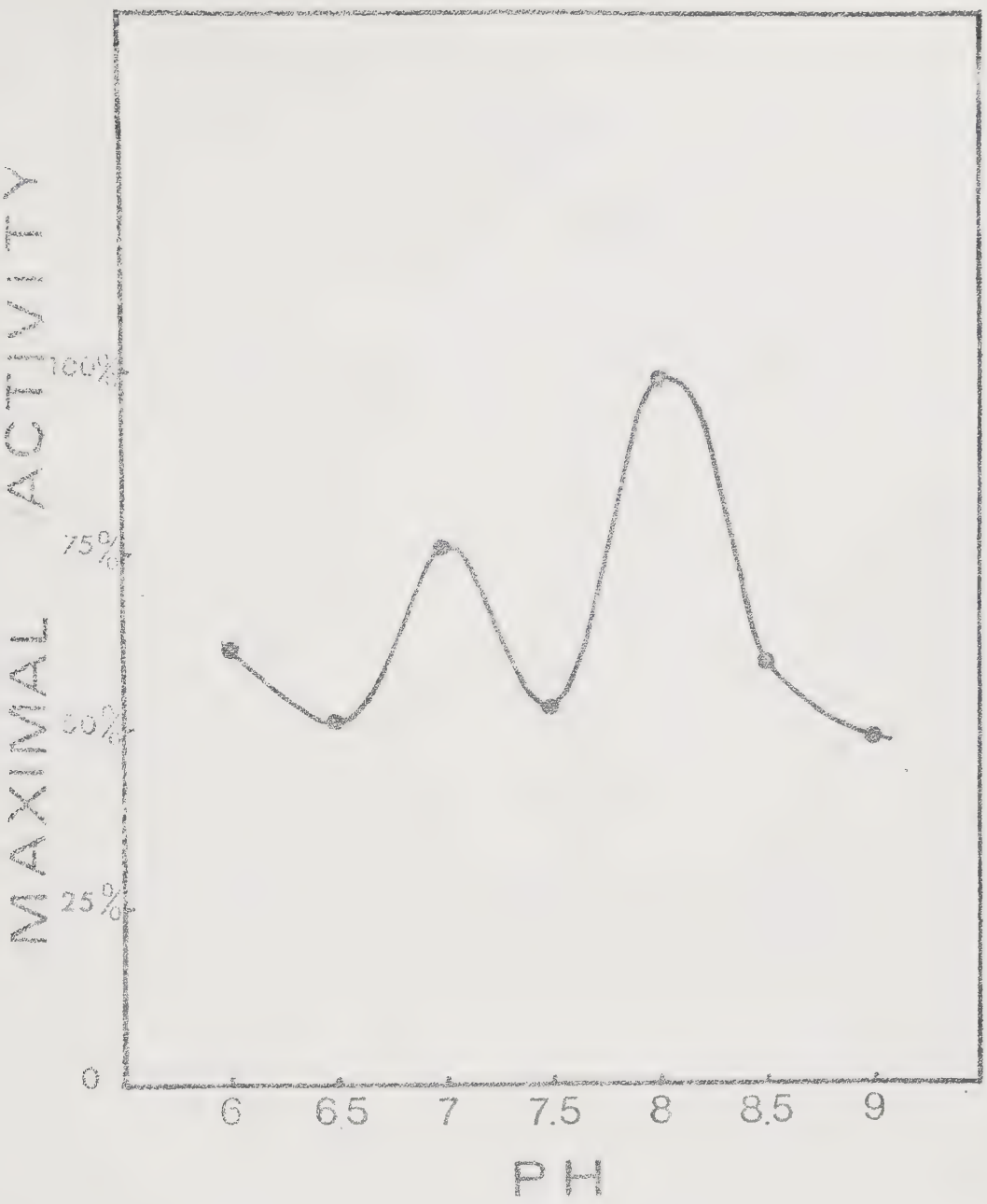


FIGURE N° VII. ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R.P.

OPTIMUM DE pH

3 µg de protéines virales sont incubées à 37°C pendant 120 mn en présence du mélange suivant (250 µl du volume final) :

ATP-^{3}H 20 µ M (0,25 µ Ci/nmole) $MgCl_2$ 1 m M; β mercaptoéthanol 40 m M, TRIS 60 m M (pH = 6; 6,5, 7; 8; 8,5 ou 9). Après incubation des échantillons de 20µl sont alors traités selon la technique décrite figure IV. Des Témoins sont réalisés dans des conditions identiques à l'exception des protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau.

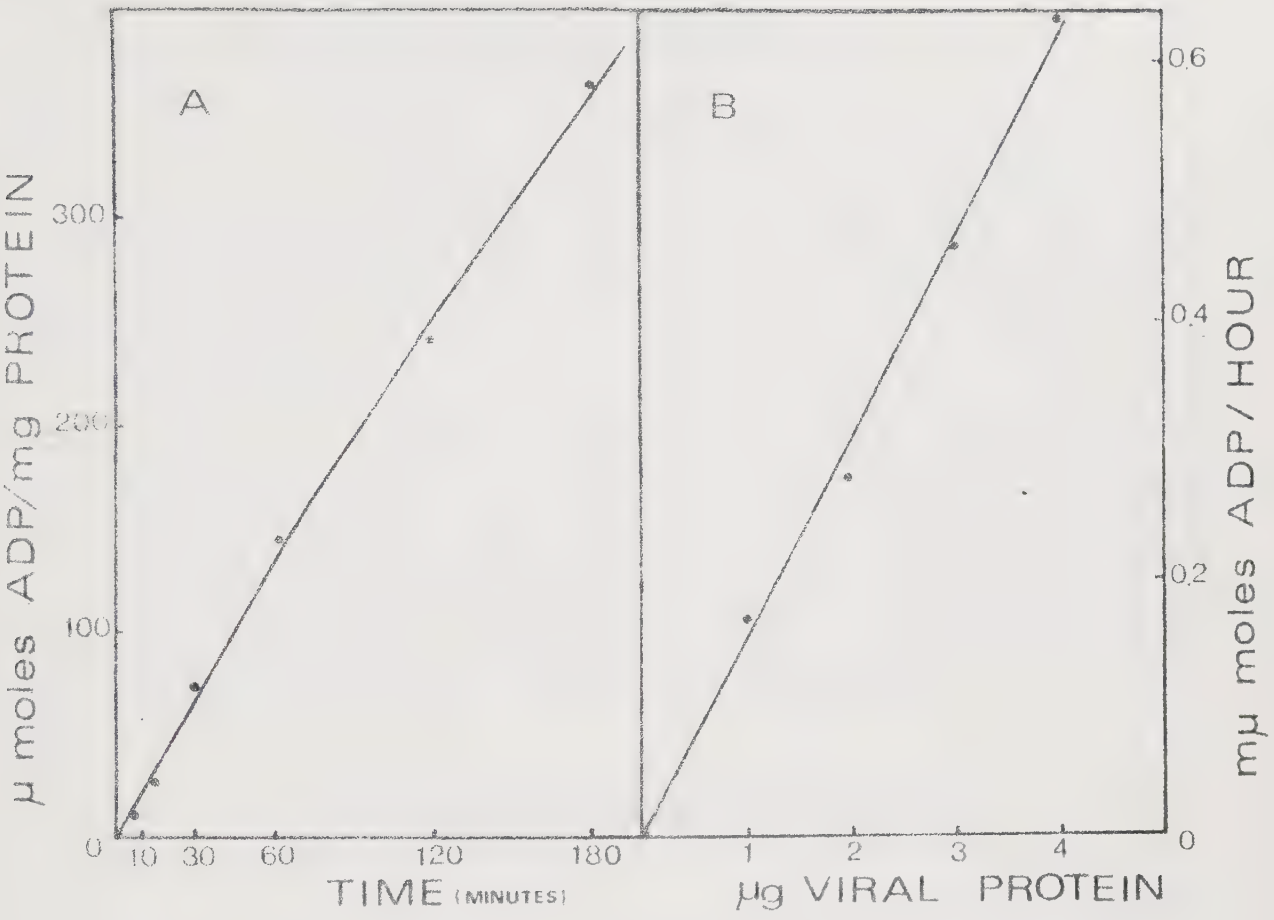


FIGURE N° VIII. ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R.P.

A. Cinétique en fonction du temps

B. Cinétique en fonction de la concentration enzymatique (protéines virales).

A. 2μg de protéines virales sont incubées à 37°C dans un mélange (volume final 250 μl contenant :

$ATP^{3}H$: 20 μM (0,25 μ Ci/nanomole); $MgCl_2$ 1 m M; β-mercaptoéthanol 40 mM; TRIS 60 m M (pH = 8,0). Des échantillons de 20 μl sont prélevés aux temps 0; 30; 60; 120 et 180 mn et traités selon la technique décrite Figure N° IV. Des témoins sont réalisés dans des conditions identiques, à l'exception des protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau.

B. 1; 2; 3 et 4 μg de protéines virales sont incubées pendant 90 mn dans un mélange identique à celui-ci décrit en A.

d/ ACTIVATEURS ET INHIBITEURS.

A la différence des ATPases mitochondriales et microsomales, l'activité de l'ATPase associée au R.P. est insensible à l'ouabaïne (Tableau N° I). Elle présente une sensibilité à l'azide de sodium.

Le mercaptoéthanol et le Nonidet P_{40} ne sont pas nécessaires pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, mais ont un rôle activateur important. Les deux optimums observés dans le cas du mercaptoéthanol (Fig. N° IX) suggèrent la présence de deux activités enzymatiques.

SPECIFICITE, VIS-A-VIS du SUBSTRAT

Exception faite de l'ATPase associée au FV_3 (44), les activités NTPase virales connues (7 , 29) ne présentent pas de spécificité étroite vis-à-vis de l'ATP.

Afin de déterminer si l'activité NTPase associée au R.P. présente une spécificité, nous avons étudié cette activité vis-à-vis des différents déoxyribonucléosides triphosphates et ribonucleosides triphosphates.

L'activité relative de l'enzyme associée au R.P. vis-à-vis de ces différents substrats est résumée dans le Tableau N° II.

Comme l'activité nucléoside triphosphate phosphohydrolase associée au réovirus (7), et au virus de la vaccine (29), l'activité enzymatique associée au R.P., ne présente pas de spécificité étroite vis-à-vis de l'ATP.

INHIBITORS ACTIVATORS		R.P.
NONE		1.00
OUABAIN 10^{-3}M		0.93
SODIUM AZIDE	10^{-1}M	0.42
	10^{-2}M	0.67
	10^{-3}M	0.53
	10^{-4}M	0.81
	10^{-5}M	1.00
NONIDET P_{40}	0.1%	7.96
	0.5%	7.37
	1%	7.89

TABLE I

Activité NTPase associée au Rabbit Pox en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs

Le mélange réactionnel suivant (250 µl) est incubé 2 heures à 37°C : ATP ^{3}H 20 µM (0,25 µCi/nmole); $MgCl_2$ 1 mM ; TRIS 60 mM (pH = 8,0); 2 µg de protéines virales en présence ou en l'absence des activateurs ou des inhibiteurs mentionnés ci-dessus.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale obtenue en l'absence d'activateurs et d'inhibiteurs.

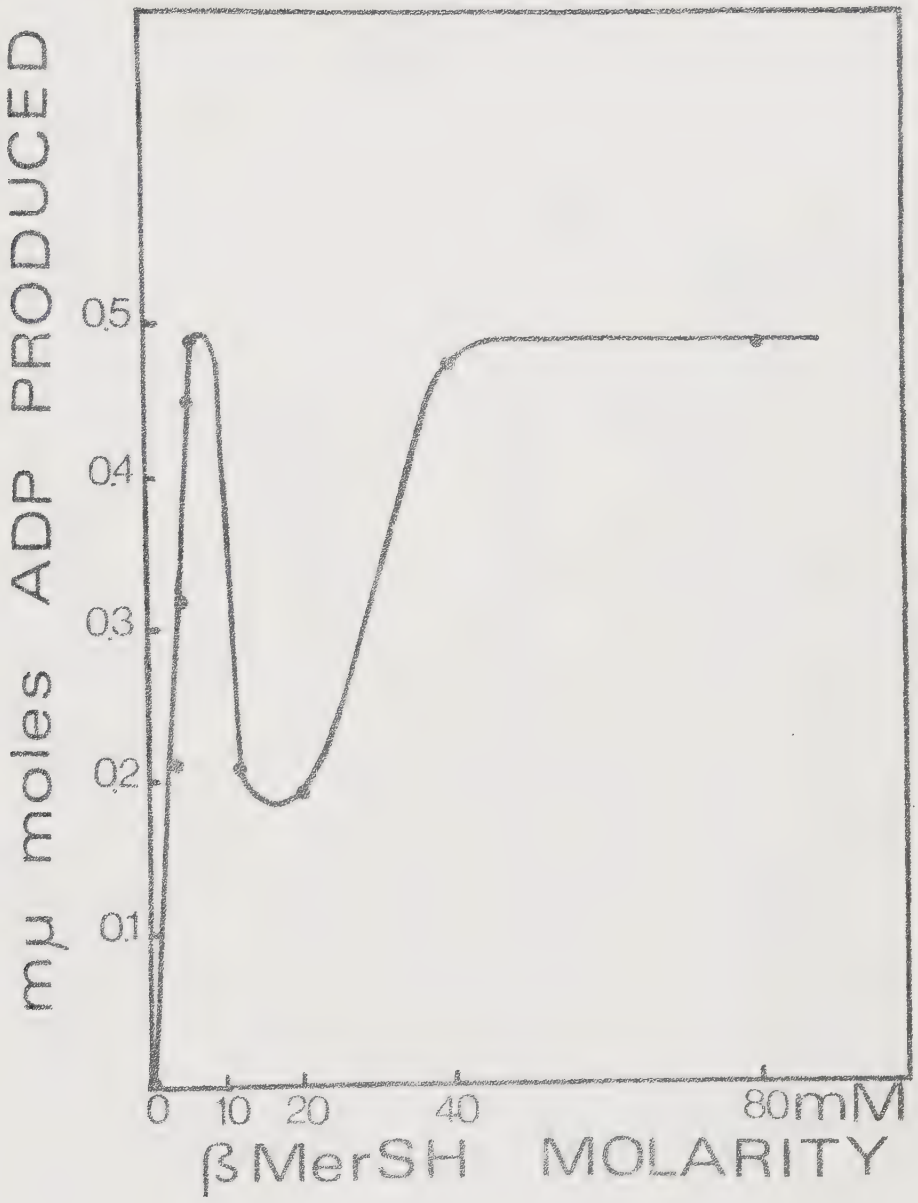


FIGURE N° IX. ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R.P. EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN β MERCAPTOETHANOL

2 µg de protéines virales sont incubées à 37°C pendant 90 mn dans un mélange (volume final 250 µl) contenant : $ATP^{3}H$ 20 µ M (0,25 µ Ci/nanomole); $Mg\ Cl_2$ 1 m M; β mercaptoéthanol à des concentrations variables de 0 à 80 m M TRIS pH = 8,0, 60 m M.

Après incubation les échantillons de 20 µl sont alors traités selon la technique décrite figure IV. Des témoins sont réalisés dans des conditions identiques à l'exception de protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau.

	R. P.
ATP H^3.....	1.00
GTPH^3.....	0.32
CTPH^3.....	0.23
UTPH^3.....	0.23
ATPH^3 + GTP*	0.84
ATPH^3 + CTP*	0.89
ATPH^3 + UTP*	1.00
d ATPH^3.....	1.00
d GTPH^3.....	0.14
d CTPH^3.....	0.05

TABLE N° II

Spécificité de l'activité NTPase associée au R. P. vis-à-vis des nucléosides triphosphates

Le mélange réactionnel incubé 90 mn à 37°C est identique à celui décrit Fig. N° VIII à l'exception des substrats radioactifs successivement présents à la concentration finale de 20 µM et des nucléotides froids GTP *, CTP * et UTP * présents à la concentration finale de 200 µM.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale.

D. LOCALISATION DE L'ACTIVITE NTPase DANS LA PARTICULE VIRALE.

Les différentes activités NTPase virales connues sont localisées au niveau des structures les plus internes des particules virales (2 , 11 , 18).

Le démasquage de l'activité ATPase du R.P. par le détergent NP_{40} (c.f. CHAPITRE N° I, C, d) laissait supposer que cette dernière pouvait également occuper une position interne dans le virion .

Afin de tenter de localiser l'activité NTPase du R.P., nous avons étudié cette activité au niveau de fractions subvirales obtenues par fractionnement de ce virus à l'aide du NP_{40}.

Dans ce but, 0,8 ml de virus marqué par la thymidine tritiée (voir méthode) sont traités par le NP_{40} (concentration finale 0,5% V/V) et par le β-mercaptoéthanol (concentration finale $7,5.\ 10^{-2}$M).

Les nucléocapsides ainsi obtenues sont alors séparées des particules virales intactes par centrifugation zonale en gradient de saccharose 25-45% P/V (23.000 g, 42 mn, 5°C). Parallèlement un témoin où le NP_{40} et le mercaptoéthanol ont été remplacés par du TRIS 0,1 M pH = 8 est traité dans les mêmes conditions.

Après collection, radioactivité et activité enzymatique ont été déterminées dans chaque fraction. La distribution de la radioactivité dans les fractions de tubes traités au NP_{40} et β-mercaptoéthanol est illustrée par la figure N° X B).

FIGURE N° X. LOCALISATION DANS LE VIRION DE L'ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R.P.

A. Virus marqué (thymidine ^3H) non traité.

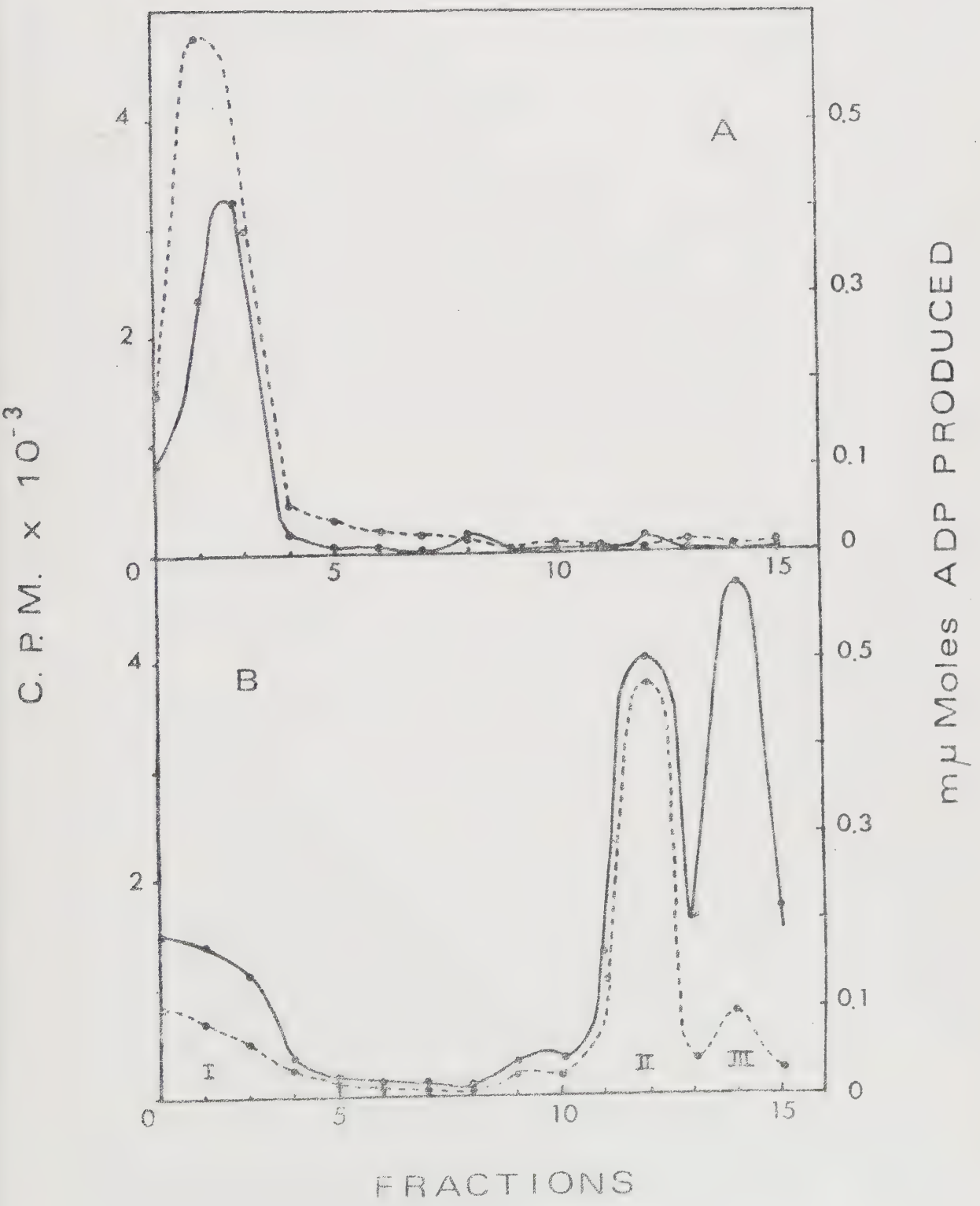
B. Virus marqué (thymidine ^3H) traité par le NP_{40} et le β mercaptoéthanol.

A. 0,8 ml de virus marqué non traité, sont déposés sur un gradient de saccharose 25-45% P/V de 16 ml et soumis à une centrifugation zonale (23.000 g, 42 mn, 5°C) dans un rotor SW_{27}.

B. 0,8 ml de virus marqué traité par du NP_{40} (0,5% P/V) et par du β mercaptoéthanol 7,5. 10^{-2} M, sont soumis à une centrifugation identique.

– – – – Radioactivité acido insoluble

———— Activité NTPase déterminée sur des échantillons de 50 µl incubés durant 5 heures dans un mélange déjà décrit figure VIII


C. P. M. x 10^{-3}
mμ Moles ADP PRODUCED
A
B
I
II
III
FRACTIONS
0
2
4
5
10
15
0.1
0.3
0.5

- Le pic I correspond à des particules intactes ayant échappé au traitement, et renferme 26% de la radioactivité totale.

- Le pic II, nettement séparé de particules virales intactes contient la majorité de la radioactivité (56%) et correspond aux nucléocapsides.

- Le Pic III, contenant 10% de la radioactivité totale, est probablement constitué de quelques fragments de nucléocapsides et de débris d'enveloppes virales.

L'activité enzymatique se trouve également répartie en trois pics après traitement par le NP_{40} et le mercaptoéthanol Ces trois pics sont superposables aux trois pics de radioactivité.

Cependant l'activité enzymatique se trouve principalement associée aux pics II (31%) et III (37%) alors que le pic I ne renferme seulement que 23% de l'activité totale.

D'autre part, les rapports activité enzymatique totale/radioactivité totale sont trois fois plus élevés dans le gradient traité par le NP_{40} et le βmercaptoéthanol, que dans le gradient non traité.

Ces résultats montrent d'une part, qu'il existe une activité enzymatique associée aux nucléocapsides, ce qui pourrait expliquer l'action activatrice du NP_{40}, et d'autre part, qu'une activité enzymatique est probablement associée aux enveloppes virales.

L'ensemble de ces résultats suggère la présence de deux activités NTPases, situées à deux niveaux différents dans la particule virale.

CHAPITRE N° II

ISOLEMENT, PURIFICATION et ETUDE ENZYMATIQUE DU MATERIAL D'ORIGINE CELLULAIRE

Le nombre croissant des enzymes associées aux virus animaux (3, 6, 20, 28, 35, 41, 7, 29, 44, 9, 38) exclut qu'elles puissent être, du moins en leur totalité, d'information virale.

Au cours de sa multiplication intracellulaire les virus animaux sont en effet susceptibles d'emprunter à la cellule-hôte certaines de ses activités enzymatiques propres.

Cet emprunt pourrait s'effectuer soit par simple adsorption vraisemblablement non spécifique, soit encore par capture de matériel cellulaire au moment de l'encapsidation du génome viral. Ne disposant pas de moyens d'étude susceptibles de mettre en évidence l'encapsidation de matériel cellulaire, nous nous sommes attachées à montrer qu'une activité enzymatique d'origine cellulaire était susceptible de s'adsorber sur une particule virale.

Disposant d'une particule virale particulièrement dense (densité $\rho \neq 1,29$) il nous suffisait d'isoler des fractions subcellulaires de densité plus faible et douées d'activité enzymatique pour que, mélangées avec la particule virale préalablement dépourvue d'activité enzymatique, on puisse les reséparer ensuite par gradient de densité. Le simple dosage de l'activité enzymatique au niveau de particules virales devait alors permettre de mettre en évidence l'adsorption d'activité enzymatique d'origine cellulaire par celles-ci. Cette étude impliquait donc successivement:

1°/ L'isolement de matériel cellulaire de faible densité et l'étude de son activité enzymatique ;

2°/ L'inactivation de l'activité enzymatique propre du virus sans altérer sa structure;

3°/ Le mélange de particules virales dépourvues d'activité enzymatique avec le matériel d'origine cellulaire et leur séparation ultérieure par centrifugation isopycnique.

A. ISOLEMENT ET PURIFICATION DU MATERIEL D'ORIGINE CELLULAIRE

Afin d'obtenir un matériel cellulaire homogène et de densité inférieure à celle du R.P. ($\rho \neq 1,29$ g / cm3), nous avons isolé les fractions de matériel cellulaire sédimentant dans la zone de $\rho \neq 1,21$ g/cm3 correspondant à celle du virus de la stomatite vésiculeuse (V.S.V.) utilisé comme marqueur de densité (13).

Les extraits cytoplasmiques de 5.10^8 cellules BHK_{21} C_{13} infectées ou non infectées par le V.S.V. ont été soumis à une centrifugation zonale en gradient de saccharose 20 - 80 % P/V (30.000 g 20 mn à +4°C).

Après avoir collecté les deux gradients nous avons déterminé la densité optique à 260 mμ et l'activité enzymatique sur chaque fraction.

Les résultats (Fig. N° XI) montrent une coïncidence entre le pic de D.O. et le pic d'activité enzymatique pour l'extrait cytoplasmique de cellules non infectées.

Pour le gradient effectué à partir de l'extrait cytoplasmique de cellules infectées, les résultats (Fig. N°XI) montrent que les pics de l'infectiosité de D.O. et d'activité enzymatique sont superposés.

Les fractions contenant l'infectiosité et les fractions correspondantes du gradient effectué à partir d'extrait cytoplasmique de cellules non infectées, sont reprises et soumises chacune à une centrifugation isopycnique en gradient de saccharose 30 - 60 % P/V (109.000 g , 4 heures , à 4°C). Puis les fractions sont collectées. Les résultats (Fig. N° XII BHK) montrent que dans le gradient effectué à partir de l'extrait cytoplasmique des cellules non infectées les pics de D.O., d'activité enzymatique et d'infectiosité se superposent dans la zone de $\rho = 1,21$ g/cm3, correspondant à celle observée pour le V.S.V. (Fig. N° XII V.S.V.).

L'étude en gel de polyacrylamide du matériel d'origine cellulaire ($\rho = 1,21$ g / cm3) a montré (fig. N° XIII)
au moins de 17 polypeptides.

L'observation au microscope électronique de ce matériel a révélé de nombreux débris cellulaires, composés en majorité de reticulum lisse, de fragments de dictyosomes (Fig. N° XIV).

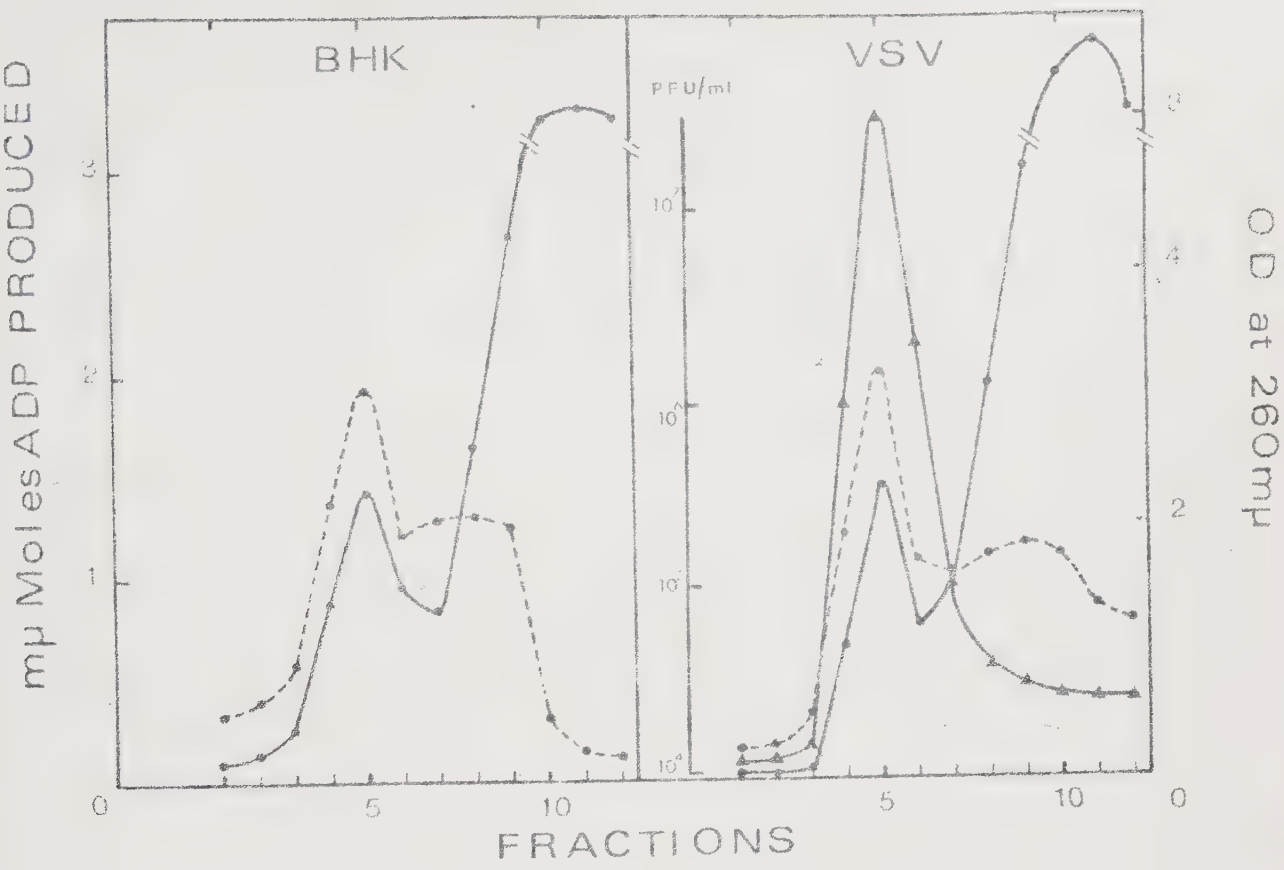


FIGURE N° XI : ISOLEMENT DE MATERIEL D'ORIGINE CELLULAIRE PAR CENTRIFUGATION ZONALE

BHK/ Centrifugation zonale d'un extrait cytoplasmique de cellules $BHK_{21}C_{13}$ non infectées.

VSV/ Centrifugation zonale d'un extrait cytoplasmique de cellules $BHK_{21}C_{13}$ infectées depuis 14 heures par du VSV (sérotype Indiana).

BHK/ 2 ml d'un extrait cytoplasmique de cellules BHK (5.10^8 cellules) sont déposés sur un gradient de saccharose 20 - 80% (P/V) de 28 ml et soumis à une centrifugation zonale (30.000g, 20 mn, 4°C).

VSV/ 2 ml d'un extrait cytoplasmique de cellules BHK (5.10^8 cellules) infectées depuis 14 heures par du VSV à une multiplicité d'infection 0,01 PFU/cellule sont soumis à une centrifugation identique.

—●—●— D.O. à 260 m μ

—▲—▲— Infectiosité déterminée par la méthode de plages sur cellules BHK_{21} C_{13} (cf matériels et méthodes).

- -●- - -●- Activité hydrolytique vis-à-vis de l'ATP déterminée de la façon suivante : 20 μl de chaque fraction sont incubés à 37°C durant 60 mn en présence du mélange suivant (250μl) : ATP^{3}H : 20 μ M (0,25μ Ci/n mole); $MgCl_2$ 6 m M; TRIS 60 m M Ph = 8,0; β mercaptoéthanol 16 m M. Des échantillons de 20 μl sont alors traités selon la technique indiquée figure IV.

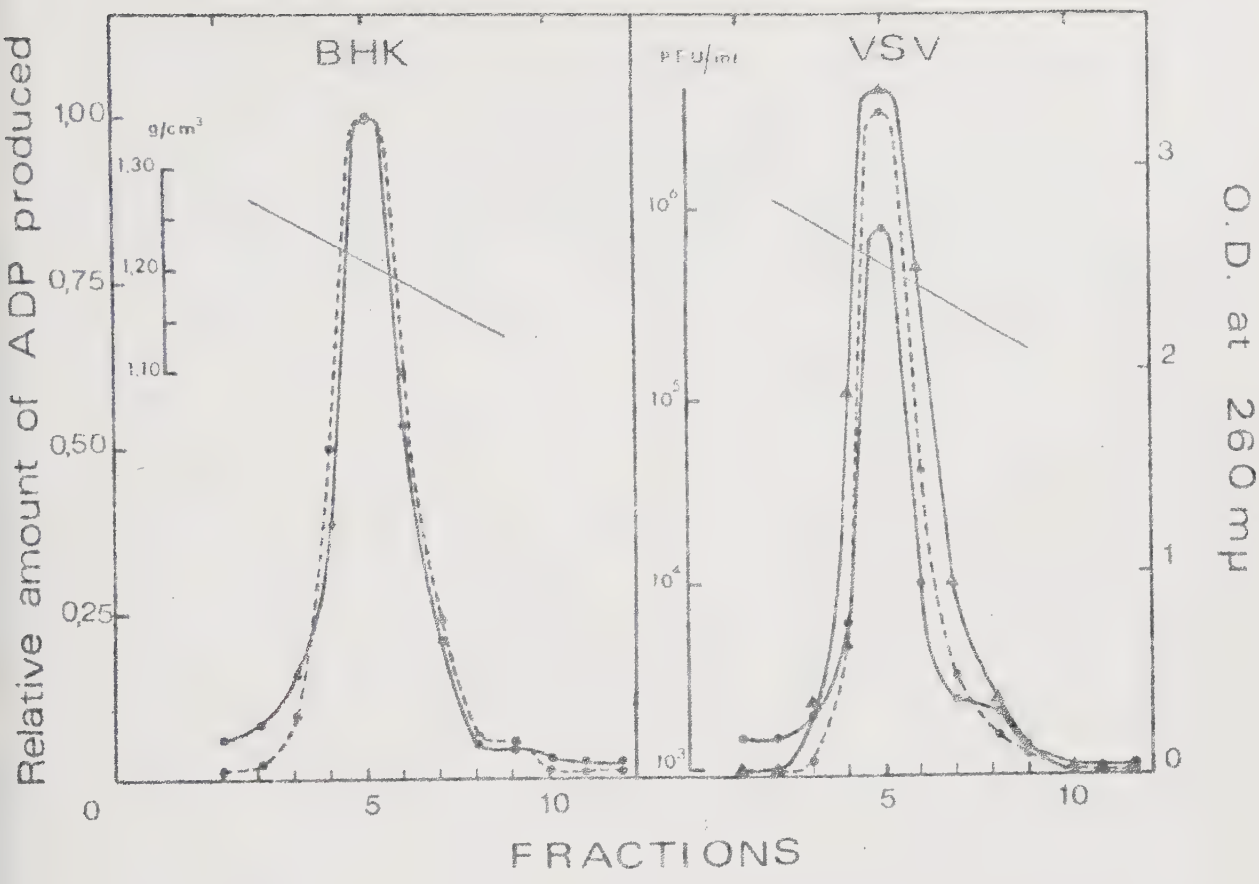


FIGURE N° XII. PURIFICATION PARTIELLE PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE DE MATERIEL CELLULAIRE ISOLE PAR CENTRIFUGATION ZONALE.

BHK/ Centrifugation isopycnique de matériel cellulaire non infecté, isolé par centrifugation zonale.

VSV/Centrifugation isopycnique de matériel cellulaire infecté, isolé par centrifugation zonale.

BHK/ Les fractions 4, 5 et 6 récupérées après centrifugation zonale sont diluées au demi par du TRIS 0,01M. Elles sont ensuite déposées sur un gradient de saccharose de 30-60% P/V de 28 ml et centrifugées (109.000 *g*, 4 h, 4°C, SW_{25}).

VSV/ Les fractions 4, 5 et 6 sont traitées de façon identique

—o—o— D.O. à 260 mμ

-o- - -o- - Activité hydrolytique vis-à-vis de l'ATP déterminée comme décrit figure XI.

—▲—▲— Infectiosité déterminée par la méthode des plages sur cellules $BHK_{21}C_{13}$ (cf matérieis et méthodes).

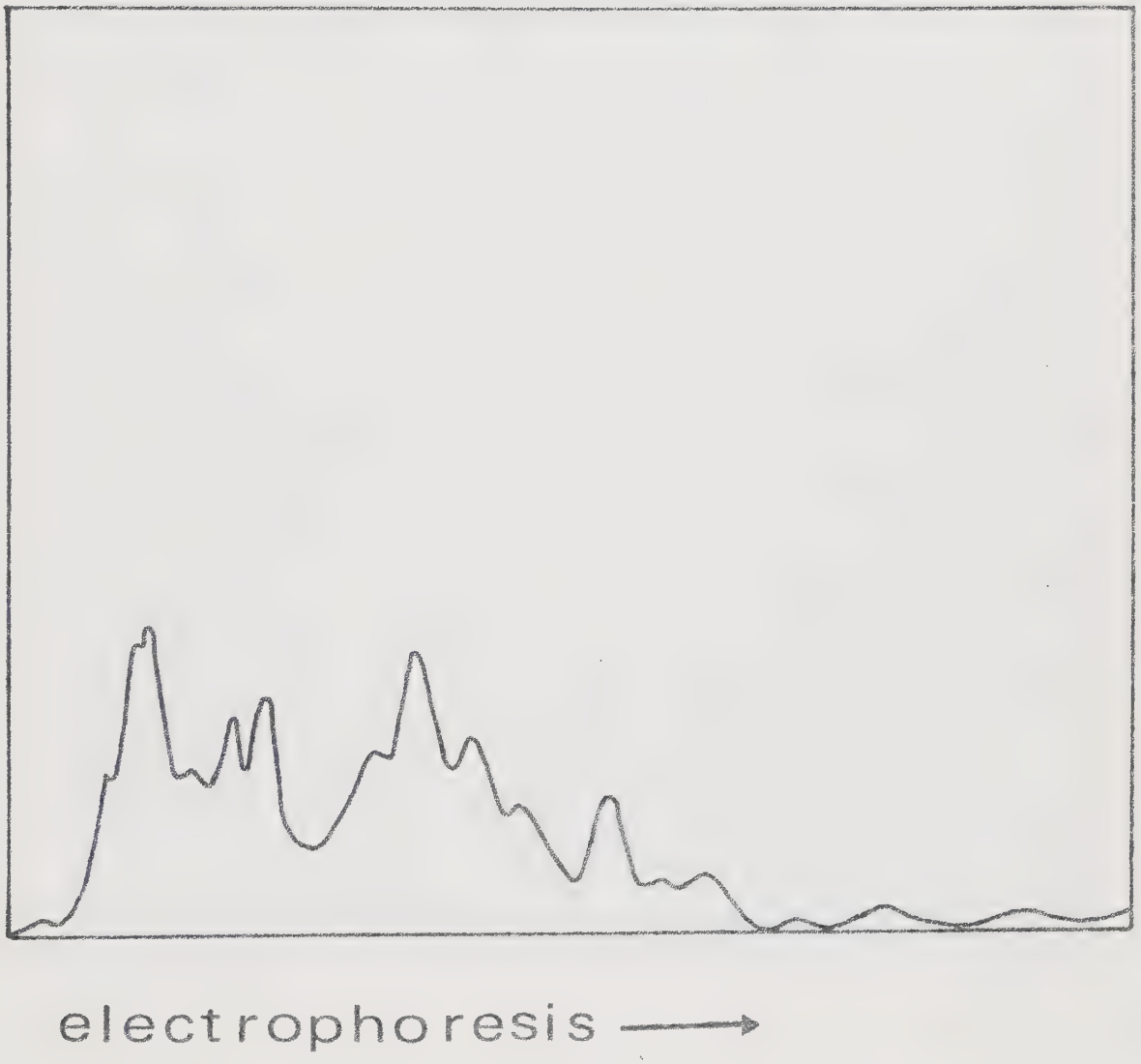


FIGURE N° XIII. ETUDE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DU MATERIEL D'ORIGINE CELLULAIRE d = 1,21 g/cm^3

- (cf = Matériel et Méthodes)

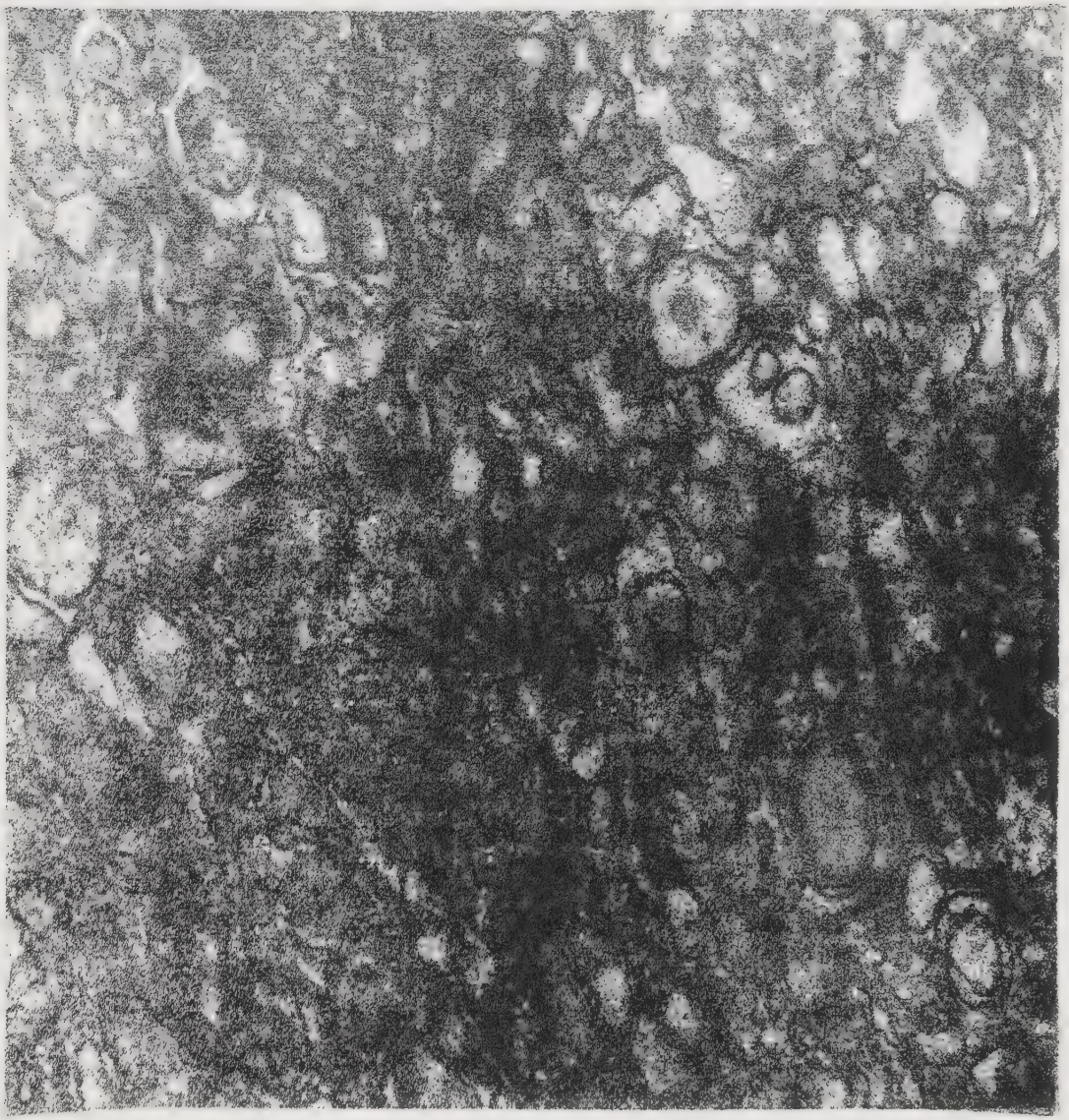


FIGURE N° XIV. ASPECT AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DU MATERIEL d'ORIGINE CELLULAIRE. d = 1,21 g/cm3

Le culot de matériel d'origine cellulaire fixé au glutaraldéhyde 5% acide osmique 1%, inclus dans "Epon" et coloré à l'acétate d'uranyle et au citrate de Pb.

(x 74.000)

Il est composé en majorité de réticulum lisse et fragments de dictyosomes.

B. ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'ATP PAR LE MATERIEL DE ρ // 1,21 g / cm3 PREPARE A PARTIR DE CELLULES BHK.

Avant d'aborder l'étude cinétique de l'activité enzymatique extraite des cellules BHK, selon la technique décrite précédemment (chapitre II - A) il était nécessaire de définir ses optima d'activité.

Nous avons également étudié l'action de différents activateurs et inhibiteurs sur cette activité enzymatique.

1°/ DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITE

a) Effet du pH:

L'étude de l'activité enzymatique d'origine cellulaire en fonction du pH montre qu'elle est maximale (Fig. N°XV) entre pH 8 et 9, l'optimum étant atteint à pH 8, 5.

En outre elle ne semble pas présenter une dépendance très stricte vis-à-vis du pH puisque dans la zone comprise entre pH 6 et pH 9 l'activité enzymatique n'est jamais inférieure à 80% de l'activité maximale.

b) Action des ions divalents et monovalents:

- Ions divalents Ca^{++}, Mg^{++} et Mn^{++} =

L'activité enzymatique est fortement stimulée par les ions Mn^{++} et présente un optimum pour une concentration de 2 mM (Fig. N°XVI).

Par contre la stimulation de l'activité enzymatique par les ions Ca^{++} est moins importante. L'activité maximale est obtenue dans une large zone de concentration allant de 2 à 8 mM. De même, les ATPases mitochondriales sont stimulées par les ions Ca^{++}; au contraire la NTPase associée au R. P. n'est que très faiblement activée.

Les ions Mg^{++} provoquent à une concentration de 6 mM, une stimulation comparable à celle des ions Ca^{++}. La propriété d'être activées par les ions Mg^{++} est commune aux NTPases cellulaires (4, 36, 43) et virales connues (7, 29,44) y compris à celle associée au R. P.

En l'absence d'E. D. T. A. il existe une faible activité résiduelle qui disparait par addition d'E. D. T. A.. Cela indique la présence de traces d'ions divalents dans la suspension virale purifiée.

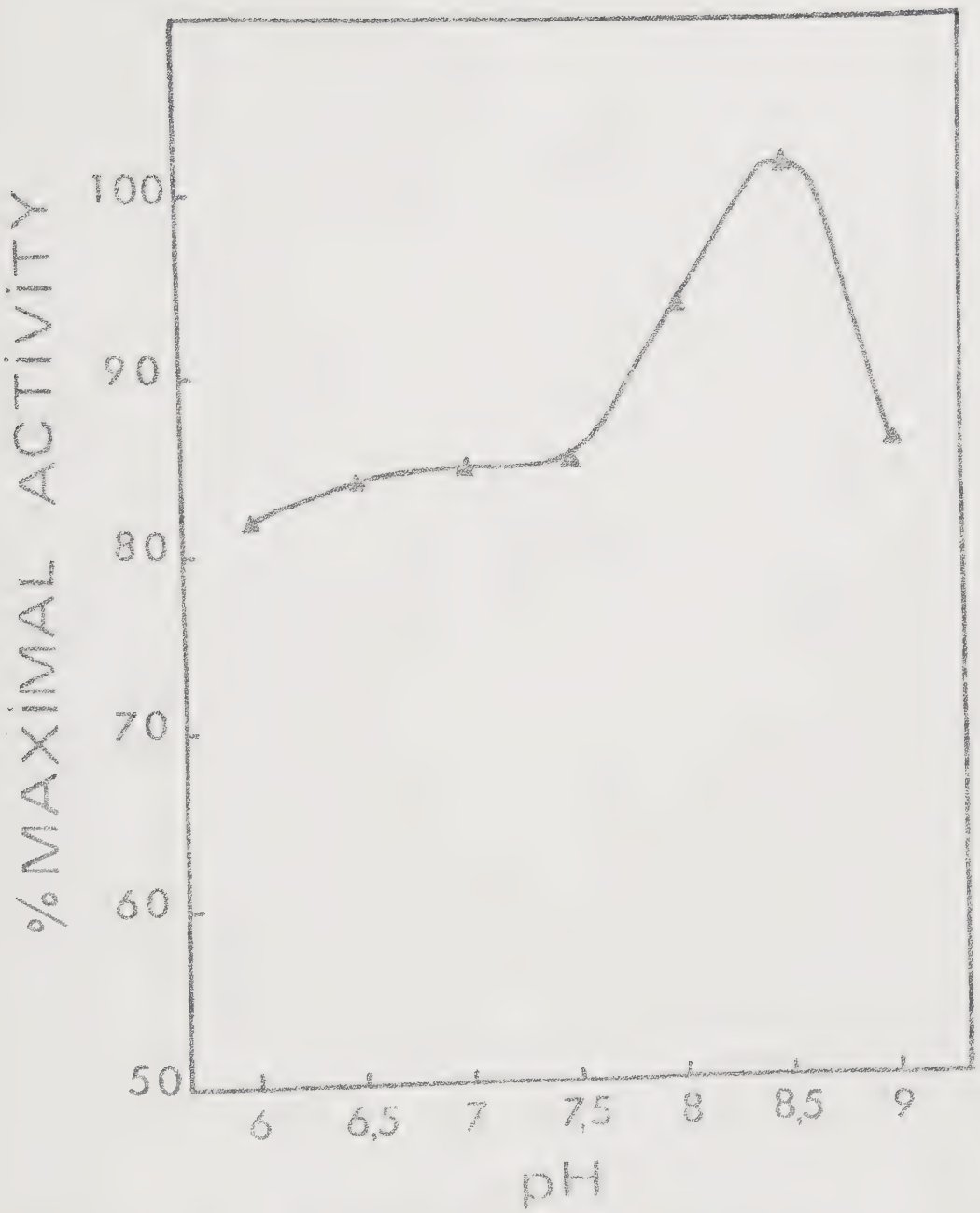


FIGURE N° XV. ACTIVITE HYDROLYTIQUE VIS-A-VIS DE L'ATP DU MATERIEL BIORIGIDE CELLULAIRE(d = 1,21 g/cm3)

(action du pH)

20 µl de protéines sont incubés à 37° durant 60 mn en présence du mélange suivant (250 µl de volume final) : $MnCl_2$ 6 mM, ATP 2H 30µ M (0,35µ Ci/micromole); Tris 60 m M pH = 6; 6,5; 7; 7,3; 8; 8,5 ou 9.

Des échantillons de 10 µ l sont traités comme décrit figure N° IV.

Les 100 % sont réalisés dans des conditions identiques, à l'exception des protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau.

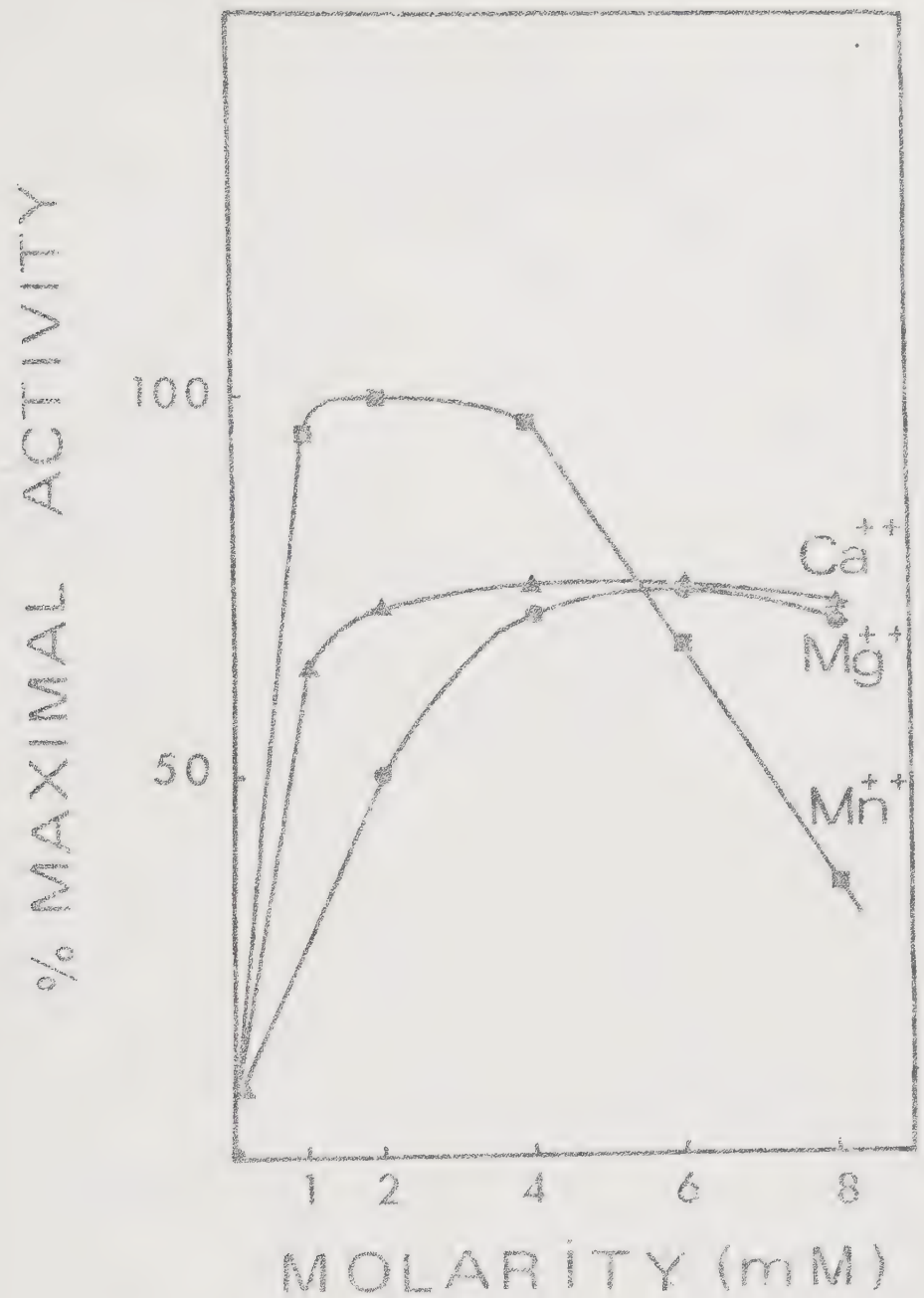


FIGURE N° XVI. ACTIVITE HYDROLYTIQUE VIS-A-VIS DE L'ATP DU MATERIEL CELLULAIRE d = 1,21 g/cm3. Détermination des concentrations optimales pour les ions divalents : Ca^{++}, Mg^{++} et Mn^{++}

20 µ g de protéines sont incubés à 37°C pendant 60 mn en présence du mélange suivant (250 µl volume final) : ATP ^{3}H 20 µ M (0,25 µ Ci/n mole); TRIS pH = 8,0 60 m M; Mg Cl_2, Mn CL_2 ou Ca Cl_2 à des concentrations variant de 0 à 8 m M.

La concentration nulle en ions divalents est obtenue par omission d'ions divalents et addition de 50 µ l d'E.D.T.A., 0,1 M.

Après incubation des échantillons de 20 µ l sont alors traités selon la technique décrite figure N° IV. Des témoins sont réalisés dans des conditions identiques, à l'exception des protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau.

- Ions monovalents Li^+, Na^+ et K^+

L'action des ions monovalents Li^+, Na^+ et K^+ sur l'activité enzymatique d'origine cellulaire a été étudiée en présence de Mg^{++}

Les résultats (Fig. N° XVII) montrent qu'à la différence des ions divalents, les trois ions monovalents sont sans action sur l'activité enzymatique.

Pour des concentrations supérieures à 10 mM on retrouve une légère diminution de l'activité enzymatique, qui n'atteint plus que 85% de l'activité maximale.

2°/ ACTIVATEURS, INHIBITEURS

L'ouabaïne, inhibiteur des ATPases mitochondriales et microsomales, ne présente d'action inhibitrice ni sur l'activité enzymatique d'origine cellulaire ni sur celle du R. P. à la concentration de 10^{-3} M.

Par contre l'azide de sodium employé à la concentration de 10^{-1} M réduit d'environ 60% l'activité enzymatique (Tableau N° III) On voit également que l'activité inhibitrice diminue avec la concentration de N_3Na pour s'annuler à partir de 10^{-5} M.

A la différence de son action vis-à-vis du R. P., le mercapto ethanol ne présente pas d'activation dans une zone de 2 à 16 mM.

De même le Nonidet P 40 ne stimule pas l'activité enzymatique à des dilutions de 0,1 à 1% (V/V) (Tableau N° III).

3°/ SPECIFICITE VIS-A-VIS DE SUBSTRAT

Elle présente une activité vis-à-vis des desoxyribonucléosides triphosphate. Les valeurs relatives obtenues étant:

d ATP: d GTP : d CTP : 1,25 : 0,35 : 0,32

Les activités relatives en ce qui concerne les ribonucléosides triphosphates dénotent une affinité particulière pour l'ATP mais révèlent l'absence de spécificité étroite de l'enzyme pour le substrat (Tableau N° IV).

4°/ CINETIQUE

Les conditions optimales sont les suivantes: ATP ^3H 20 pM (0,25 µCi/nanomole); $MgCl_2$ 2 mM; TRIS HCl 60 mM pH 8,5; proteine (20 µg) dans un volume final de 250 µl

L'étude cinétique de l'activité enzymatique en fonction du

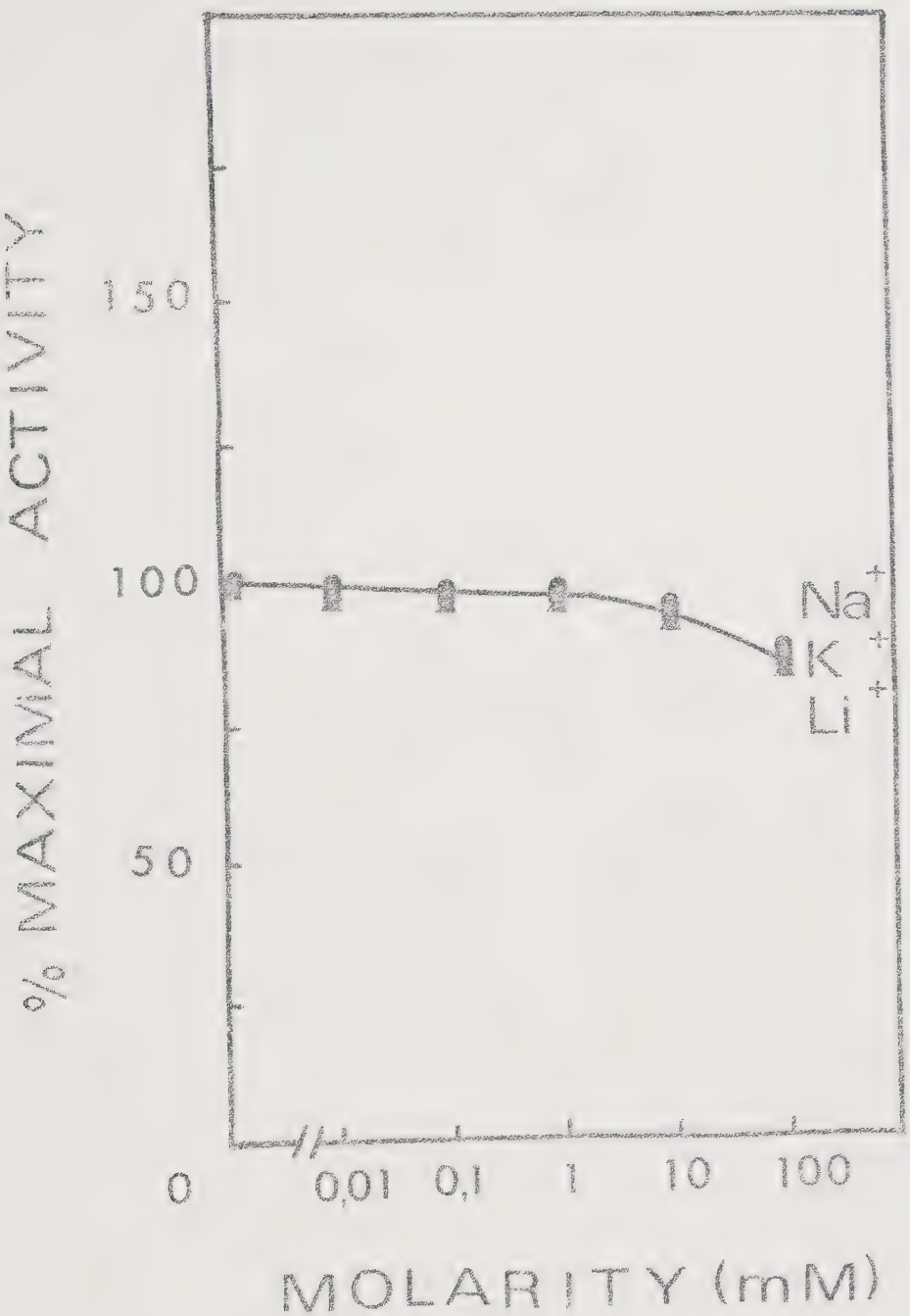


FIGURE N° XVII. ACTIVITÉ HYDROLYTIQUE VIS-A-VIS DE L'ATP DU MATERIEL CELLULAIRE d = 1,21 g/cm³, DETERMINATION DES CONCENTRATIONS OPTIMALES POUR LES IONS MONOVALENTS : Li^+, Na^+ et K^+.

20 µ g de protéines sont incubés à 37°C pendant 60 mn en présence du mélange suivant (250 µ l de volume final) : ATP ^{3}H 20 µ M (0,25 µ Ci/n mole); TRIS pH = 8,0 60 mM; $Mg\,Cl_2$ 6 mM; Li Cl, Na Cl ou K Cl à des concentrations variant 0; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ou 100 m M. Après incubation les échantillons de 20 µ l sont alors traités selon la technique décrite figure N° IV. Les témoins sont réalisés dans des conditions identiques, à l'exception des protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau.

INHIBITORS ACTIVATORS	BHK
None	1.00
Ouabain 10^{-3} M	0.98
Sodium Azide 10^{-1}	0.44
10^{-2}	0.62
10^{-3}	0.70
10^{-4}	0.83
10^{-5}	1.00
Mercaptoéthanol 2 mM	1.03
4 mM	1.04
6 mM	1.00
16 mM	1.03
Nonidet P_{40} 0.1%	0.95
0.5%	0.98
1%	0.99

TABLE N° III

Activité hydrolytique vis-à-vis de l'ATP du matériel d'origine cellulaire (densité = 1,21 g/cm3) en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs.

Le mélange réactionnel suivant (250 µl) est incubé à 37°C durant 30 mn: ATP ^{3}H 20 µM (0,25 µ Ci/nmole); TRIS pH = 8,5, 60 mM ; $MgCl_2$ 6 mM; 20 µg de protéines cellulaires en présence ou en l'absence des activateurs ou des inhibiteurs mentionnés ci-dessus. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale obtenue en l'absence d'activateurs et d'inhibiteur

	EMR
ATP H^3	1,00
GTP H^3	0,61
CTP H^3	0,41
UTP H^3	0,23
ATP H^3 + GTP*	0,13
ATP H^3 + CTP*	0,23
ATP H^3 + UTP*	0,70
d ATP H^3	1,35
d GTP H^3	0,35
d CTP H^3	0,32

TABLE N° IV

Spécificité de l'activité hydrolytique associée au matériel d'origine cellulaire (densité = 1,21 g/cm3) vis-à-vis des nucléotides triphosphates.

Le mélange réactionnel incubé 30 mn à 37° C est identique à celui décrit Fig. N° XVIII à l'exception des substrats radioactifs successivement présents à la concentration finale de 50 µM et des nucléotides froids GTP *, CTP *, et UTP * présents à la concentration finale de 200 µM.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale.

temps montre (Fig. N° XVIII) que l'apparition d'ADP est linéaire jusqu'à 6 heures et proportionnelle à la quantité de protéines.

Parallèlement à l'apparition d'ADP on note une importante formation d'AMP.

L'étude de cette importante production d'AMP montre que le matériel d'origine cellulaire de densité $\rho \neq 1,21$ g/cm3 ne présente pas une activité ATPase caractéristique et suggère que ce matériel pourrait être porteur d'une activité phosphatasique.

Afin de nous assurer de la présence d'une activité phosphatasique nous avons étudié l'activité enzymatique du matériel cellulaire vis-à-vis du paranitrophénylphosphate.

Pour cela, 100µl du matériel d'origine cellulaire de $\rho \neq 1,21$ g/cm3 sont incubés à 37°C au B.M. en présence de 300 µl d'un mélange réactionnel contenant : p-nitrophenylphosphate (1 mM) et $CaCl_2$ (2,5mM) dans du TRIS 1 M pH = 8.

Un témoin où le matériel d'origine cellulaire est remplacé par l'eau distillée subit le même traitement.

A des temps variables, la quantité de produit PNP formé est estimée au spectrophotomètre à 410 mµ.

Les résultats, calculés en déduisant les blancs, montrent (Fig. N° XIX) que l'on est bien en présence d'une activité phosphatasique. Par ailleurs on peut constater que la vitesse de libération de p-nitrophénol est linéaire.

En conclusion, on a vu d'une part que l'ATP est hydrolysé jusqu'au stade AMP, d'autre part que le PNP-phosphate subit une hydrolyse en PNP. Ces résultats suggèrent que l'activité enzymatique associée au matériel cellulaire pourrait être une activité phosphatasique. Cependant la présence simultanée d'une activité ATPasique et d'une activité phosphatasique ne peut être exclue.

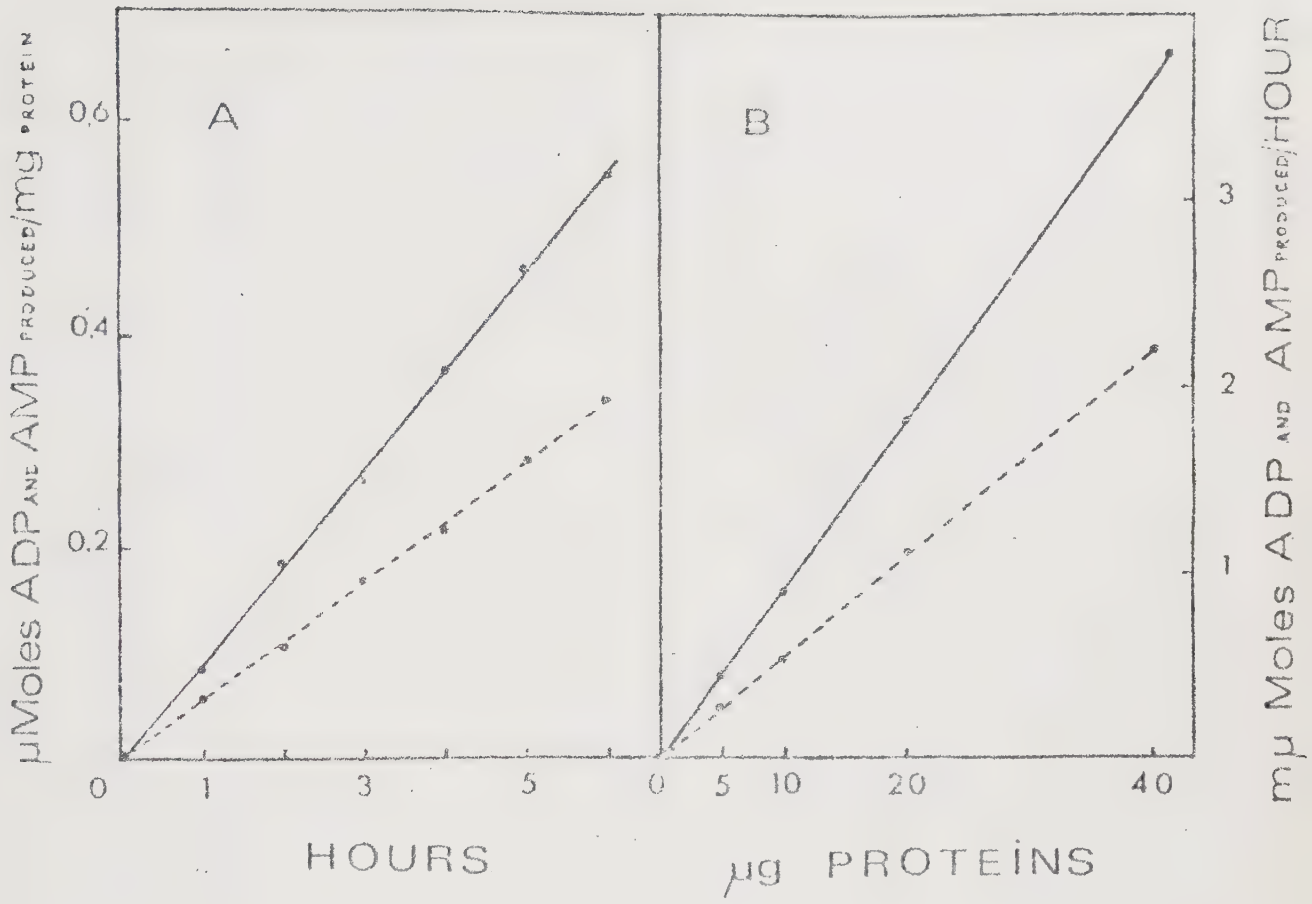


FIGURE N° XVIII. ACTIVITE HYDROLYTIQUE VIS-A-VIS de l'ATP, DU MATERIEL D'ORIGINE CELLULAIRE d = 1,21 g/cm3

A. Cinétique en fonction du temps.

B. Cinétique en fonction de la concentration enzymatique (protéines cellulaires)

A. 20 µg de protéines sont incubés à 37°C en présence d'un mélange (250 µl volume final) contenant : ATP ^{3}H 20 µ M (0,25 µ Ci/n mole); TRIS 60 m M pH = 8,5; $MgCl_2$ 2 m M. Des prélèvements de 20 µ L sont effectués au temps 0; 60; 180 et 300 mn et traités selon la technique décrite figure N° IV.

B. 0; 5; 10; 20 et 40 µg de protéines sont incubés 60 mn à 37°C dans le mélange décrit ci-dessus.

—o—o— production d'ADP

- - o - - o - production d'AMP

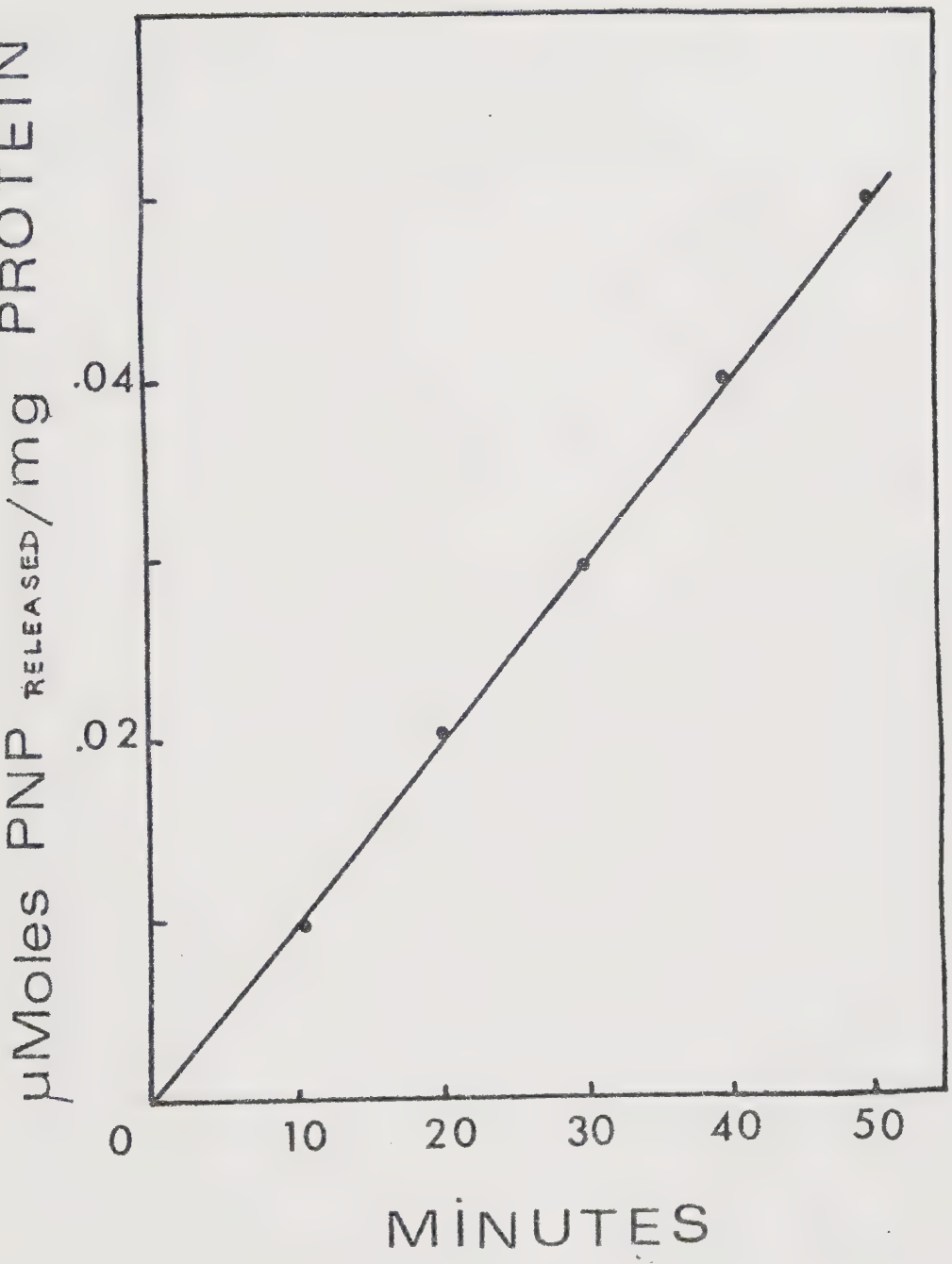


FIGURE N° XIX. HYDROLYSE DU PARANITROPHENYLPHOSPHATE EN PARANITROPHENOL (PNP) + PHOSPHATE SOUS L'ACTION DU MATERIEL D'ORIGINE CELLULAIRE (d = 1,21 g/cm3), 100 µ l de matériel cellulaire (d = 1,21 g/cm3) sont incubés à 37°C en présence du mélange suivant (volume final 3,1 ml) : TRIS 1 M pH= 8,0; $CaCl_2$ 2,5 m M; p-nitrophenylphosphate 1 m M. Le mélange est photométré à 410 mµ à différents temps (0; 10; 20, 30; 40 et 50 mn) contre un témoin sans matériel cellulaire.

CHAPITRE N° III

ET
INHIBITION DE L'ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R. P. A ENTRAINEMENT DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'ORIGINE CELLULAIRE PAR DES PARTICULES VIRALES TRAITEES PAR LA BETA-PROPIOLACTON

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle une activité enzymatique d'origine cellulaire était capable de s'adsorber sur le virus, il nous suffisait de mélanger le matériel cellulaire obtenu ($\rho \# 1,21$ g/cm3 à du virus dont la NTPase était préalablement inactivée ($\rho \# 1,29$ g/cm3 et de doser l'activité enzymatique d'origine cellulaire entrainée par le virus.

A. PURIFICATION DU MATERIEL D'ORIGINE CELLULAIRE

L'extrait cytoplasmique de 5.10^8 cellules BHK_{21} C_{13} est soumis à deux centrifugations successives en gradients de saccharose. La première centrifugation, zonale, gradient de saccharose 20-80 o/o P, (30.000 g, 20 mn, 4°C), et la seconde isopycnique, en gradient de saccharose 30-60 ·/. P/V (109.000 g, 4 h., 4°C) nous ont permis d'obtenir un matériel homogène de $\rho \# 1,21$ g/cm3 (cf. chapitre II, A).

B. INHIBITION DE L'ACTIVITE NTPase ASSOCIEE AU R. P.

En l'absence d'inhibiteurs spécifiques connus des activités NTPases virales nous avons cherché parmi les agents physiqueset chimiques le plus susceptible d'inactiver la NTPase associée au R. P. sans altérer la structure du virion.

Nous avons tenté, dans un premier temps, d'inhiber l'activité enzymatique par dénaturation thermique.

a) Agent physique: chaleur

Nous avons étudié l'action de la chaleur en chauffant le virus pendant deux heures à 56°C.

Au bout d'une heure l'activité enzymatique n'était pas totalement inhibée.

Après deux heures d'incubation on a pu constater la disparition complète de l'activité enzymatique.

Cependant en soumettant le virus ainsi traité à une centri

fugation en gradient de densité en saccharose 50-70 % P/V (96.300, 120 mn, 4°C) on a pu constater l'absence totale de particules virales d la région de densité: 1,29 g/cm3 correspondant à la densité du virus ir tact.

Puisque l'inactivation thermique de l'activité NTPase du R. P s'accompagne de la dégradation de la structure du virus, nous avons da un second temps tenté d'inhiber l'activité enzymatique de ce virus par l bêta-propiolactone. Ce produit, utilisé dans la préparation de nombre vaccins viraux(17, 23, 24) est en effet susceptible de détruire le pouvo infectieux d'une particule virale tout en conservant son pouvoir antigén que. Cette propriété caractéristique d'une action ménagée au niveau d protéines virales, laissait présager une éventuelle action inactivatrice niveau de l'activité NTPase associée au R. P.

De plus l'hydrolyse spontanée de ce produit à la température laboratoire (34) assure son élimination du milieu réactionnel.

b) Agent chimique: bêta-propiolactone.

0,3 ml de virus R. P. (2.10^7 PFU/ml 460 ug de protéines/ ont été traités à 37°C par des concentrations croissantes de bêta-prop lactone.

Les résultats (Fig. N°XX) montrent que l'on obtient une inhi tion de l'activité NTPase proportionnelle à la concentration de bêta-pr lactone utilisée. Une inhibition complète de l'activité enzymatique est obtenue pour une concentration de bêta-propiolactone égale à 10% V/V

L'examen au microscope électronique des particules traitée par cette concentration ne révèle pas d'altérations notables dans la mo phologie des particules virales (Fig. N° XXI).

De même la centrifugation à l'équilibre des virions traités a tre que leur comportement en gradient isopycnique de saccharose (50-70 % P/V) est identique à celui des virions non traités.

L'ensemble de ces résultats montre que le traitement du R. par la bêta-propiolactone (concentration 10 % V/V) inhibe l'activité N associée à ce virus sans provoquer d'altération notable de sa structur

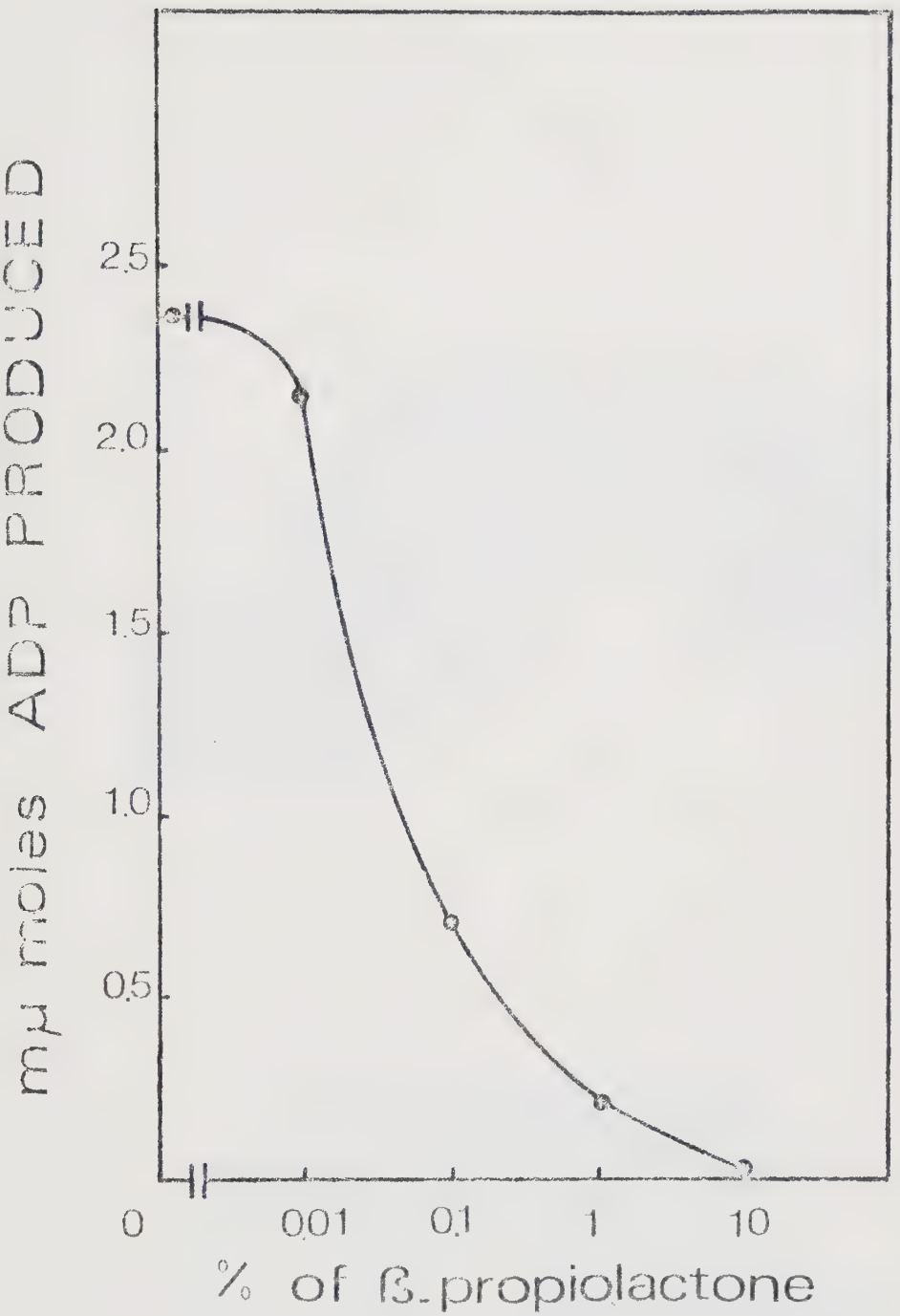
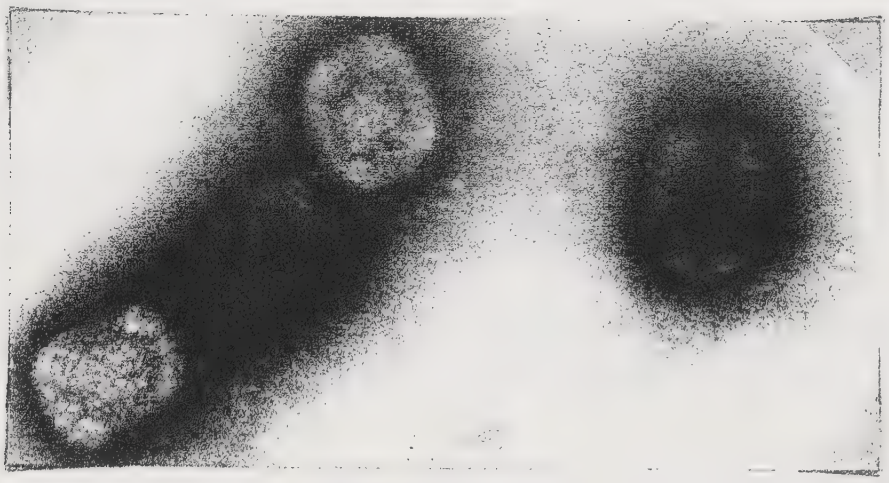


FIGURE N° XX. INACTIVATION DE LA NTPase ASSOCIEE AU RAGBTT PDX PAR LA β-PROPIOLACTONE

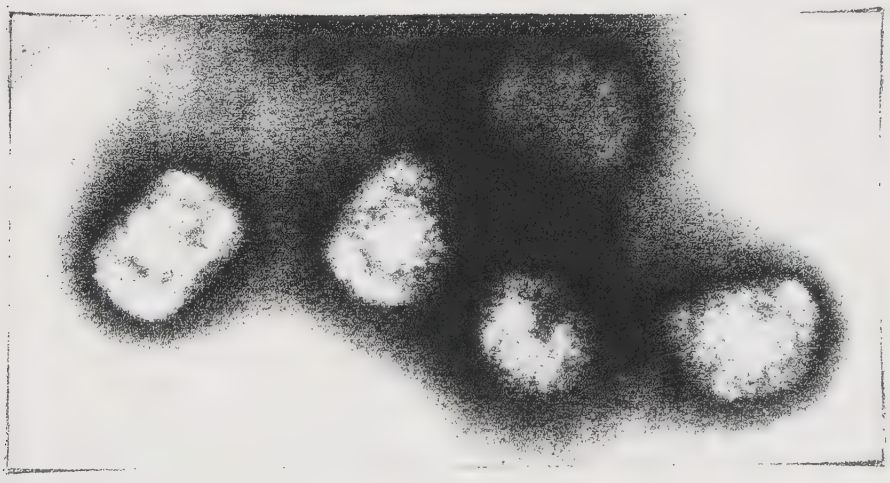
8 µg de protéines virales sont incubées à 37°C durant 60 mn en présence d'un mélange (volume final 240 µl) β-propiolactone : 0; 0,01; 0,1; 1 et 10% (V/V); β mercaptoéthanol 2 m M; $MgCl_2$ 6 m M; TRIS 60 m M pH = 8,0

On ajoute ensuite de l'ATP ^3H 20 µ M (0,25 µ Ci/n mole) sous un volume de 10 µ l.

On incube 60 mn à 37°C, et des échantillons de 20 µ l sont alors traités selon la technique décrite Figure N° IV. Des témoins sont réalisés dans des conditions identiques à l'exception des protéines virales remplacées par un volume équivalent d'eau.



A



B

FIGURE N° XXI. ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DU RABBIT POX acide phosphotungstique (x 74.000)

A. Non traité par la β-propiolactone

B. Traité par 10% (V/V) de β-propiolactone.

C. ENTRAINEMENT DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'ORIGINE CELLULAIRE PAR DES PARTICULES VIRALES TRAITEES PAR LA BETA-PROPIOLACTONE

Du virus R. P. purifié, dont l'activité enzymatique est ina tivée par la bêta-propiolactone, est mélangé avec du matériel d'origine cellulaire de densité # 1, 21 g/cm3.

La différence de densité entre le virus et le matériel cellu laire devait nous permettre de reséparer par centrifugation isopycnique les deux constituants de ce mélange.

Trois éventualités pouvaient se présenter lors de cette sé paration:

- ou bien l'activité enzymatique cellulaire n'est pas adsorb sur la particule virale et elle se trouve en totalité à la surface du gradie de saccharose 50-70 ·/. P/V.

- ou bien, la particule virale adsorbe une partie de l'activi enzymatique celle-ci sera répartie entre les densités = 1, 29 g/cm3 et 1, 21 g/cm3 (cette dernière ne pénétrant pas dans le gradient).

- dans le cas peu probable où la particule virale adsorber la totalité de l'activité enzymatique, celle-ci devait migrer en totalité avec le virus à la densité = 1, 29 g/cm3.

Deux témoins, l'un contenant 0, 3 ml du R. P. marqué à la thymidine tritiée , traités par la bêta-propiolactone, et l'autre 0, 3 ml de la fraction subcellulaire (densité = 1, 21 g/cm3) ont été soumis à une cen trifugation isopycnique en gradient de saccharose 50 - 70 ·/. P/V (96. 300 g, 2 h., 4°C).

Parallèlement un mélange de 0, 3 ml du R. P. marqué à la thymidine H^3, et traité par la bêta-propiolactone concentration 10 ·/. V et 0, 3 ml du matériel cellulaire de densité 1, 19 g/ cm3 a été traité dans les mêmes conditions.

Les résultats (Fig. N° XXII A) montrent que dans le témo matériel cellulaire de densité 1, 21 g/ cm3 la totalité de l'activité enzym tique flotte à la surface du gradient de saccharose 50 - 70 ·/. P/V.

Le témoin virus traité par la bêta-propiolactone (Fig. N° XXII B) montre l'absence totale d'activité enzymatique au niveau des par ticules virales.

FIGURE N° XXII. ENTRAINEMENT DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'ORIGINE CELLULAIRE PAR DES PARTICULES DE RABBIT POX DONT L'ACTIVITE NTPase A ETE INACTIVEE PAR LA BETA-PROPIOLACTONE

A. Distribution de l'activité enzymatique associée au matériel d'origine cellulaire après centrifugation isopycnique (—•— — —•)

0,3 ml du matériel d'origine cellulaire (d = 1,21 g/cm3 dilués par 0,3 ml de TRIS 0,1 M pH = 8,0 sont déposés à la surface d'un gradient de 4,5 ml de saccharose (50-70% P/V (96.300 g; 120 mn 4°C; rotor SW_{50}).

Des échantillons de 50 µl de chaque fraction sont incubés 6 heures à 37°C en présence d'un mélange réactionnel déjà décrit figure N° XVIII.

Des échantillons de 20 µ l sont alors traités selon la technique décrite figure IV.

B. Distribution de l'activité enzymatique (—•— —•— —•) et du marquage (thymidine ^3H (————)) associés au R.P., après centrifugation isopycnique..

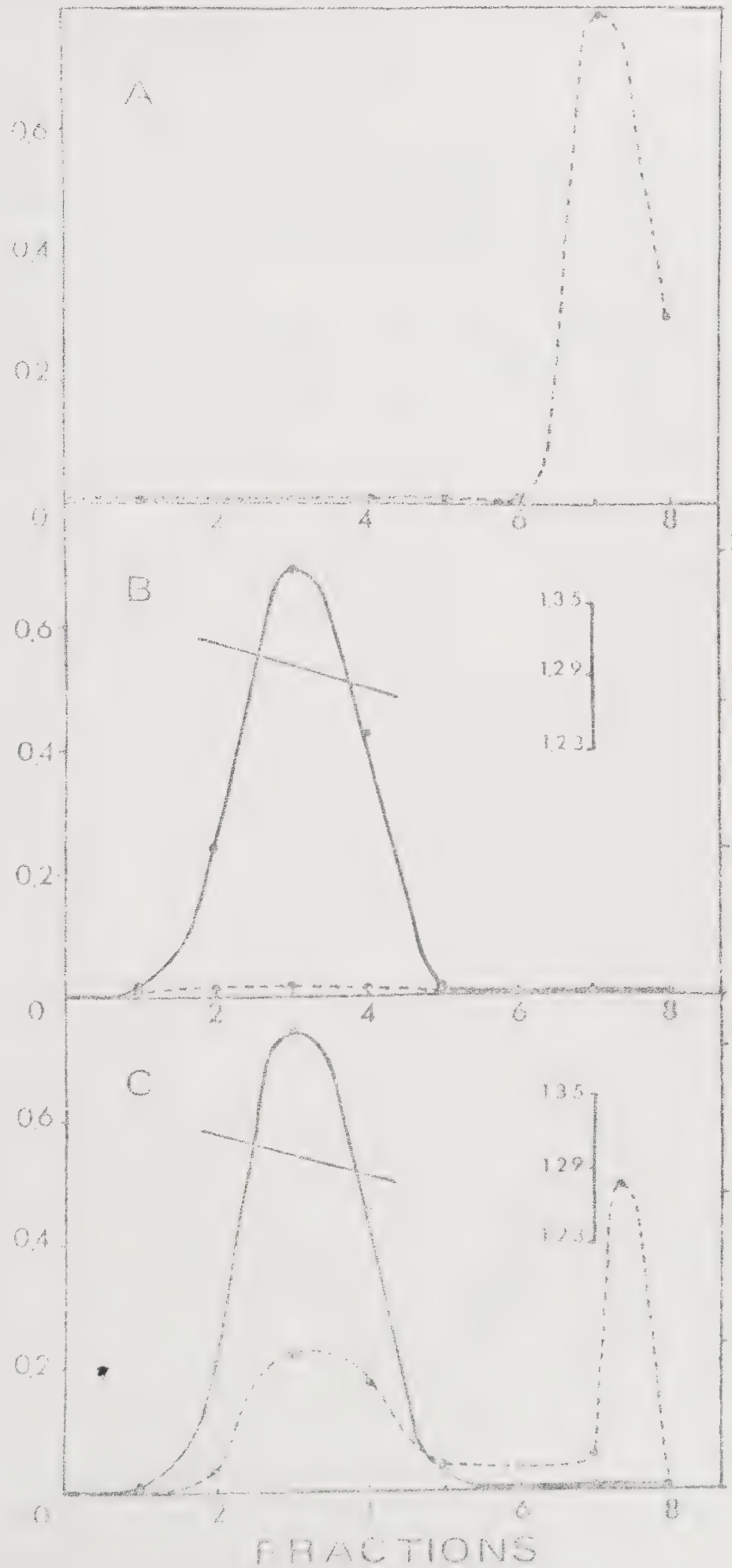
0,3 ml de R.P. inactivé par la β-propiolactone (10% V/V) est marqué à la thymidine tritiée, dilués par 0,3 ml de TRIS 0,1 M pH = 8,0 sont soumis à une centrifugation isopycnique, analogue à celle décrite en A. La radioactivité est déterminée sur des échantillons de 0,1 ml de chaque fraction du gradient.

L'activité NTPase est déterminée selon la technique décrite en A.

C. Entraînement lors d'une centrifugation isopycnique de l'activité enzymatique d'origine cellulaire (— —•— —) par le Rabbit Pox (repéré par marquage à la thymidine tritiée (————).

A 0,3 ml de R.P. marqué (thymidine ^3H) et inactivé par la β-propiolactone (10% V/V) on ajoute 0,3 ml de matériel d'origine cellulaire. Ces 0,6 ml sont soumis à une centrifugation isopycnique analogue à celle décrite en A.

L'activité NTPase et la radioactivité sont déterminées comme précédemment.


A
B
C
0.6
0.4
0.2
0
2
4
6
8
1.35
1.29
1.23
30
20
10
0
mU MULES ADP PRODUCED
c.p.m. / ml x 10-3
FRACTIONS

Le mélange du matériel d'origine cellulaire densité 1,21 g/cm3 et de virus traité par la bêta-propiolactone (Fig. N° XXII C) montre que 40% de l'activité enzymatique migrent au niveau de la densité 1,29 g/cm3.

L'ensemble de ces résulats montre qu'une activité enzymatique d'origine cellulaire peut être adsorbée de manière vraisemblablement non spécifique par une particule virale .

DISCUSSION - CONCLUSION

Si l'activité NTPase associée au R. P. présente de nombreu ses analogies avec les autres NTPases virales connues (Tableau N°V), elle s'en différencie par la plupart de ses optima (7, 29, 44). L'étude de sa faible activation par le Ca^{++}, et de l'action d'inhibiteurs des ATPase cellulaires a montré qu'elle se différencie également de la plupart des ATPases cellulaires connues (4, 42).

Bien que les activités NTPases associées aux réovirus (7) et au virus de la vaccine (29) aient été assimilées à une activité ATPase, leur activité vis-à-vis de quatre nucléosides triphosphates ne permet pas de l'affirmer. De même l'activité de la NTPase associée au R. P. vis-à-vis de quatre nucléosides triphosphates (cf. : résultats chapitr N°1, C, e) ne permet pas de conclure à une activité ATPase. Dans l'état actuel de nos recherches il est impossible de savoir s'il s'agit d'une seul activité enzymatique présentant une affinité différente pour les quatre nucléosides triphosphates ou s'il s'agit de quatre enzymes différentes: ATPase; GTPase; CTPase; UTPase.

L'action activatrice du NP40 sur l'activité NTPase associé au R. P., et la présence de cette activité enzymatique dans les nucléocap sides de ce virus, montrent que cette enzyme occupe une position interne dans la particule virale. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus à l'aide de techniques différentes, par Gold et Dales chez le virus de la vaccine (11) et par Kapuler et coll. chez le réovirus (18). De même, l'activité ATPase associée au FV_3 occupe une position interne dans le virion (2). L'ensemble de ces résultats montre que les activités NTPas associées aux différents virus sont fermement attachées aux virions.

Munyon et Paoletti (29) ont observé l'existence de trois optima de pH et de $[Mg^{++}]$ pour l'activité NTPase associée au virus de la vaccine. De même, en ce qui concerne le R. P. (du même sous-groupe que la vaccine) nous avons mis en évidence l'existence de deux optima pou les différents paramètres suivants: $[Mn^{++}]$, $[Na^{+}]$, $[K^{+}]$, [bêta-mercaptoethanol] et pH. Munyon et coll. n'ayant formulé aucune hypothèse pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous supposons la présence de deux activités NTPases différentes dans la même particule virale. Cette hypothè également étayée par le fait qu' après traitement par le NP_{40} en présenc

TABLEAU N° V

Activité enzymatique NTPase	pH	Ions monovalents			Ions divalents		Inhibiteurs		Activateurs		Localisation	Spécificité vis-à-vis de l'ATP
		Li^+	Na^+	K^+	Mg^{++}	Ca^{++}	Ouabaïne	N_3Na	NP_{40}	MerSH		
R.P.	7; 8	±	±	±	++	±	-	±	++	+	Nucléocapside et probablement l'enveloppe	NON
VACCINE	7, 6; 8, 4; 8, 8	N.T.	-	-	++	±	±	N.T.	N.T.	+	Nucléocapside	NON
FV_3	8	-	-	-	++	-	-	-	+	+	Particules subvirales	OUI
REOVIRUS	7, 8	++	±	-	++	±	-	N.T.	N.T.	N.T.	Nucléocapside	NON

Activités NTPase associées à différents virus

Tableau récapitulatif des données connues

N.T. : non testé

de bêta-mercaptoethanol, suivi d'une séparation en centrifugation zonale on observe deux pics d'activité NTPase, l'un associé aux nucléocapsides, l'autre associé vraisemblablement aux enveloppes virales.

Dans l'état actuel de nos recherches il est impossible de décider si l'une ou l'autre de ces enzymes est d'information virale ou d'information cellulaire.

Dans l'attente de pouvoir déterminer l'origine de ces enzymes nous avons voulu démontrer qu'une activité NTPase d'origine cellulaire pouvait éventuellement s'adsorber sur une particule virale. Nos résultats, en accord avec ceux de Joklik (16), Tan et coll. (39) qui ont montré que différentes activités enzymatiques cellulaires pouvaient s'adsorber à la surface d'une particule virale, posent le problème de savoir si une enzyme d'origine cellulaire peut être considérée comme faisant partie de la structure d'un virion et peut jouer un rôle dans une des différentes étapes biochimiques de sa multiplication.

Différents rôles ont été attribués à l'activité NTPase viral Par analogie avec le rôle mieux connu des ATPases cellulaires on peut penser que les NTPases virales, dont la présence n'a été mise en évidenc jusqu'à présent que dans le virus à environnement protéique complexe, pourrait jouer un rôle de transporteur d'ions (1 , 8 , 30 , 40 , 4) activant la particule virale lors de son arrivée dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Cet échange d'ions et de métabolites pourrait jouer un rôle dans la décapsidation et éventuellement permettre le fonctionnement de la RNA-polymérase (43).

Un autre rôle a été envisagé par Kapuler (18) suivant lequ la NTPase associée à la nucléocapside virale pourrait avoir un rôle régul teur dans la transcription par hydrolyse des nucléosides triphosphates né saires au fonctionnement de la transcriptase virale. Par ailleurs la présence d'une protéine-kinase associée au R. P. (résultats non publiés) et la présence de cette enzyme chez la plupart des virus porteurs d'une NTPase (31 , 9) permet de penser qu'il peut exister une relation entre ces deux activités enzymatiques. La démonstration par Martello et coll. (2 6) du rôle de la protéine-kinase dans la transcription de l'ADN de T_4 in vitro par phosphorylation du facteur sigma de la RNA polymérase d'E. coli ouvre la porte à l'étude du rôle éventuel de ces deux enzymes

dans les transcriptions des virus animaux.

BIBLIOGRAPHIE

- ATKINSON A., GATENBY A.D., and LOWE A.G. - Subunit structure of the Na, K-dependant transport ATPase. Nature New Biology, 1971, 233, 145-6.

- AUBERTIN A.M., PALESE P., TAN K.B., VILAGINES R. and McAUSLAN B.R. - Proteins of polyhedral cytoplasmic deoxyvirus : III Structure of Frog virus 3 and location of virus associated Adenosine Triphosphate Phosphohydrolase. J. Virol., 1971, 8, 643-8.

- BALTIMORE D., HUANG A.S. and STAMPFER M. - Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus : II An RNA polymerase in the virion. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1970, 66, 572-6.

- BOERGMAN R.J., MANERY J.F. and PINTERIC L. - The separation and partial purification of membrane bound $(Na^+ - K^+)$-independent Mg^{2+}-ATPase from frog skeletal muscle. Biochimica Biophysica Acta, 1970, 203, 506-30.

- BONISSOL C., DURIEUX M.F. - Bull. Ordre Nat. des Pharmaciens - 1973 (sous presse)

- BORSA J. and GRAHAM A.F. - Reovirus : RNA polymerase activity in purified virions. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1968, 33,896-9

- BORSA J., GROVER J. and CHAPMAN J.D. - Presence of nucleoside triphosphate phosphohydrolase activity in purified virions of Reovirus J. Virol., 1970, 6, 295-302.

- CHARNOCK J.S., and COOK D.A. - Role of energized states of $(Na^+ + K^+)$-ATPase in the Sodium pump. Nature New Biology, 1971, 233, 171-2

- DANGLOT C., VILAGINES R, de TEMMERMAN N. et ATANASIU P. - Etude de l'activité protéine-kinase associée au virus de la stomatite vésiculeuse (V.S.V.). C.R. Acad. Sc. Paris, 1973, 276, série D 2751.

- EASTERBROOK, K.B. - Controlled degradation of vaccinia virions in vitro : an electron microscopic study. J. Ultrastructure Research, 1966, 14, 484-96.

- GOLD P. and DALES S. - Localization of nucleotide phosphohydrolase activity within vaccinia. Proc. N. A. S., 1968, 60, 845-52.

12 - HOLOWCZAK J.A. and JOKLIK W.K. - Studies on the structural proteins of virions and cores. Virology, 1967, 33, 717-25.

13 - HUANG A.S., GREEWALT J.W. and WAGNER R.R. - Defective T particules in Vesicular Stomatitis Virus. I. Preparations, morphology and some biologic properties. Virology, 1966, 30, 161-72.

14 - JANSEN J. - Experimenteel Onderzoek van Konijnensterfte Door Een Filtreer Baar Virus. TIJDSCHR. DIERGENEESK, 1942, 69, 505-14.

15 - JOKLIK W.K. - The Poxviruses. Bacteriol. Rev., 1966, 30, 33-66.

16 - JOKLIK W.K. - The Poxvirus. Annual Rev. of Microbiology, 1968, 22, 359-90.

17 - KAPLAN M.M. and KOPROWSKI. - Laboratory techniques in rabies. World Health Organization. 1973.

18 - KAPULER A.M., MENDELSOHN N., KLETT H. and ACS G. - Four base-specific nucleoside 5'-triphosphatases in the subviral core of Reovirus. Nature (London), 1970, 225 1209-13.

19 - KATES J. and BEESON J. - Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. The mechanism of synthesis and release of RNA in vaccinia cores. J. Molecular Biology, 1970, 50, 1-18.

20 -KATES J.R. and McAUSLAN B.R. - Poxvirus DNA dependent RNA polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1967, 58,134-41.

21 - KATZ E. and MOSS. - Vaccinia virus structural polypeptides derived from a higher molecular weight precursor : formation and integration into virus particles. J. Virol., 1970, 6, 717-26.

22 - KIRN A. - Multiplication des Pox Virus. Cours de Microbiologie Générale I.P. 1972-73.

23 - LEPINE P. et ATANASIU P. - Communication sur la valeur antigénique et vaccinante du virus de Newcastle inactivé par la bêta-Propiolactone. Ann. Inst. Pasteur, 1956, 100.

24 - LEPINE P. et SAUTTER V. - Inactivation de virus par l'action combinée de deux agents inactivants employés à doses ménagées. C.R. Acad. Sci., 1957, 244, 2200.

25 - LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDAL R.J. - Protéin measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem., 1951, 193, 265.

26 - MARTELO O.J., WOO S.L.C., REIMANN E.M. and DAVIE E.W. - Effect of protein kinase on ribonucleic acid polymeras Biochemistry, 1970, 9, 4807-13.

27 - MORRISON J.F. - Chromatographic separation of nucleoside phosphates on diethylaminoethyl cellulose paper. Anal. Biochem., 1968, 24, 106-11.

28 - MUNYON W. PAOLETTI E. and GRACE Jr J.T. - RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1967, 58, 2280-7.

29 - MUNYON W.E., PAOLETTI E. OSPINA J. and GRACE Jr J.T. - Nucleotide phosphohydrolase in purified vaccinia virus J. Virol., 1968, 2, 167-72.

30 - OPIT L.J. and CHARNOCK - A molecular model for a sodium pump. Nature, 1965, 208, 471-474.

31 - PAOLETTI E. and MOSS B. - Protein kinase and specific phosphate acceptor. Proteins associated with vaccinia virus cores. J. Virol., 1972, 10, 417-24.

32 - PLANTEROSE D.N., NISHIMURA C. and SALZMAN N.P. - The purification of vaccinia virus from cell cultures. Virology, 1962, 18, 294-301.

33 - RANDALL Ch. C., ROGERS W.H., DOWNER N.D. and GENTRY G. - Protein kinase activity in equine herpesvirus. J. Virology, 1972, 9, 216-222.

34 - SCHMITZ-MASSE M.O. - Analyse de la bêta-propiolactone par chromatographie gaz-liquide. 1° Recherche d'un résidu de la bêta-propiolactone dans le vaccin antirabique Pasteur. 2° Etude de la courbe d'hydrolyse de la bêta-propiolactone pH 7,4. J. Chromatogr. 1972, 70, 128-34.

35 - SHATKIN A.J. and SIPE J.D. - RNA polymerase activity in purified reoviruses. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1968, 61, 1462-9.

36 - SKOU JENS CHR. - The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochimica et Biophysica Acta., 1957, 23, 394-401.

37 - SOKOL F., KUWERT E., WIKTOR J. HUMMELER K. and KOPROWSKI H. - Purification of rabies virus grown in tissue culture. J. of Virology, 1968, 2, 836-49.

38 - STRAND M. and AUGUST T. - Protein kinase and phosphate acceptor. - Proteins in rauscher murine leukaemia virus. Nature New Biology, 1971, 233, 137-40.

39 - TAN B.K. and McAUSLAN B.R. - Binding of deoxyribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerase to poxvirus. J. of Virology, 1972, 9, 70-4.

40 - TAYLOR E.W. - Chemistry of muscle contraction. Annual of Review of Biochemistry, 1973, 41, 577-611.

41 - TEMIN H.M. and MIZUTANI S. - RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature (London), 1970, 226, 1211-13.

42 - ULRICH Frank. - The activation of mitochondrial Adenosine triphosphatase by calcium. Biochemica et Biophysica Acta, 1965, 105, 460-71.

43 - VILAGINES R. - Contribution à l'étude du virus 3 de la grenouille et de son développement en cultures cellulaires. Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, 1972.

44 - VILAGINES R. and McAUSLAN B.R. - Proteins of Polyhedral cytoplasmic deoxyvirus. II Nucleotide phosphohydrolase activity associated with Frog virus 3. J. of Virology, 1971, 7, 619-24.

45 - WESTWOOD J.C.N. and BOULTER P.H. - The titration of vaccinia virus on the chorioallantoic membrane of the developing chick embryo. J. Hyg., 1957b, 55, 123-39.

46 - WESTWOOD, J.C.N., HARRIS W.J. ZWARTOUW H.T.,TITMUSS D.H.J. and APPLEYARD G. - Studies on the structure of vaccinia virus. J. Gen. Microbiol., 1964, 34, 67-78.